

Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene
der Technischen Universität München
Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. Hermann Wagner, Ph.D. (Melbourne)

Generierung und Analyse einer LIGHT defizienten Mausmutante

Stefanie Susanne Scheu

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
genehmigten Dissertation

Vorsitzende: Univ.-Prof. Dr. S. Weinkauff

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. A. Gierl
2. Univ.-Prof. Dr. K. D. Pfeffer
3. Univ.-Prof. Dr. J. Buchner

Die Dissertation wurde am 18.02.2002 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 07.05.2002 angenommen.

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis.....	I-V
Abbildungsverzeichnis.....	VII-VIII
Tabellenverzeichnis.....	IX
Abkürzungsverzeichnis.....	XI
1 EINLEITUNG	1
1.1 LIGHT als Mitglied der TNF Superfamilie.....	1
1.2 Die TNF Superfamilie in der Ontogenese sekundärer lymphatischer Organe.....	5
1.2.1 Die TNF/LT Familie in der Organogenese von Lymphknoten und Peyer'schen Plaques	7
1.2.2 Die Funktion der LT/TNF Familie in der Ausbildung der Mikroarchitektur der Milz.....	8
1.3 TNF Familien Mitglieder als kostimulatorische Moleküle in der T Zell Aktivierung	10
1.4 Bisherige Studien über LIGHT	12
1.5 Zielsetzung der Arbeit	14
2 MATERIAL UND METHODEN	15
2.1 Bezugsquellennachweis.....	15
2.1.1 Chemikalien.....	15
2.1.2 Radiochemikalien.....	16
2.1.3 Enzyme	17
2.1.4 Reagenzien und Verbrauchsmaterial	17
2.1.5 Geräte	18
2.2 Medien und Puffer.....	19
2.2.1 Stammlösungen und Puffer.....	19
2.2.2 Medien für die Bakterienkultur.....	22
2.2.3 Medien für die Zellkultur	23

2.3	Hemm- und Zusatzstoffe	24
2.3.1	Antibiotika	24
2.3.2	X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid)	24
2.3.3	IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalaktosid)	25
2.4	Bakterienstämme, Zelllinien und Versuchstiere	25
2.4.1	Bakterienstämme	25
2.4.2	Zellen und Zelllinien	26
2.4.3	Versuchstiere	26
2.5	Primer und Antikörper	27
2.5.1	Antikörper und Protein Standards	31
2.6	Plasmidvektoren	33
2.6.1	Ausgangsvektoren	33
2.6.2	Im Rahmen der Arbeit hergestellte Vektoren	34
2.7	Molekularbiologische Arbeitsmethoden	34
2.7.1	Isolierung von Plasmid-DNS	34
	<i>Alkalische Lyse</i>	34
	<i>Qiagen Kits</i>	35
2.7.2	Isolierung von chromosomaler DNS	35
2.7.3	Agarosegelelektrophorese	36
	<i>Analytische Agarosegelelektrophorese</i>	36
	<i>Präparative Agarosegelelektrophorese</i>	37
	<i>Bestimmung von Fragmentgrößen</i>	37
2.7.4	Enzymatische Behandlung von DNS	37
	<i>Restriktionsverdau</i>	37
	<i>Klenowbehandlung von DNS</i>	38
	<i>Dephosphorylierung von DNS</i>	38
2.7.5	Ligation von DNS-Molekülen	38
	<i>TA Cloning®Kit</i>	38
2.7.6	Transformation von <i>E.coli</i> Bakterien	39
2.7.7	Southernblot Analyse	39
	<i>Alkalischer DNS-Transfer auf Nylonmembranen</i>	39
	<i>Radioaktive Markierung der Sonde</i>	40
	<i>DNS/DNS Hybridisierung</i>	40
2.7.8	Amplifikation von DNS-Molekülen durch PCR	41
2.7.9	Isolierung gesamtzellulärer RNS aus Gewebe	42
	<i>Puffer und Lösungen</i>	42
	<i>Durchführung</i>	44
2.7.10	Isolierung gesamtzellulärer RNS aus Zellen	44
2.7.11	cDNS Synthese	45
2.7.12	Elektrophoretische Auftrennung von RNS	45

2.7.13	Northernblot Analyse.....	46
	<i>Transfer von RNS auf Nylonmembranen</i>	46
	<i>Radioaktive RNS/DNS Hybridisierung</i>	47
2.8	Zellkultur.....	47
2.8.1	Kultivierung von CHO Zellen	47
	<i>Zellkultur von CHO Zellen</i>	47
	<i>Elektroporation von CHO Zellen</i>	48
	<i>Selektion stabiler CHO-Zellklone</i>	48
2.8.2	Kultivierung embryonaler Stammzellen und embryonaler Fibroblasten.....	49
	<i>Zellkultur von ES/EF Zellen</i>	49
	<i>Elektroporation von ES Zellen</i>	49
	<i>Selektion rekombinanter ES-Zellklone</i>	49
	<i>Einfrieren von ES Zellen</i>	50
2.8.3	Kultivierung von Splenozyten	50
2.8.4	Kultivierung von Dendritischen Zellen aus Knochenmark.....	51
2.9	Tierversuche.....	51
2.9.1	Superovulation	51
2.9.2	Gewinnung embryonaler Fibroblasten.....	51
2.9.3	Generierung chimärer Mäuse.....	51
2.9.4	Organentnahme	52
2.9.5	Immunisierung von Mäusen	52
2.9.6	Infektion mit Vesikulärem Stomatitis Virus (VSV).....	52
2.9.7	Infektion mit Listerien	52
2.9.8	Hauttransplantation	53
2.10	Immunologische und zellbiologische Methoden.....	53
2.10.1	Immunhistochemie	53
	<i>Immunhistochemie zur Analyse am Hellfeld-Mikroskop</i>	53
	<i>Immunhistochemie zur Analyse am konfokalen Laser-Mikroskop</i>	54
2.10.2	Proliferationsassays	54
	<i>[3H]-Thymidineinbau</i>	54
	<i>CFSE-Assay</i>	55
2.10.3	Allogene "Mixed Lymphocyte Reaction" (MLR).....	55
2.10.4	CTL Chrom-Assay.....	55
2.10.5	Durchflußzytometrie (FACS-Analyse)	56
	<i>FACS-Analyse von Oberflächenantigenen</i>	57
	<i>Intrazelluläre Zytokinfärbung</i>	57
2.10.6	ELISA.....	57
	<i>Detektion von Hapten-spezifischen Immunglobulin Subklassen im Serum</i>	57
	<i>Detektion von Zytokinen in Zellkulturüberständen</i>	57

3	ERGEBNISSE	59
3.1	Charakterisierung der murinen LIGHT cDNS	59
3.1.1	Klonierung der murinen LIGHT vollen Länge cDNS	59
3.1.2	Analyse der murinen LIGHT Proteinsequenz	60
3.1.3	Rezeptorbindungseigenschaften des murinen LIGHT	61
3.1.4	Expression von LIGHT in murinen Geweben	62
3.2	Charakterisierung des genomischen Lokus für murines LIGHT	62
3.2.1	Klonierung des genomischen Lokus für murines LIGHT	62
3.2.2	Chromosomale und subchromosomale Lokalisation des murinen LIGHT Gens	64
3.3	Generierung einer LIGHT defizienten Mausmutante	66
3.3.1	Klonierung des LIGHT-Rekombinationsvektors	67
	<i>Klonierungsstrategie</i>	67
	<i>Neomycin-Resistenz Kasette</i>	67
	<i>Herpes Simplex Virus Thymidinkinase (HSV-TK) Kasette</i>	68
3.3.2	Generierung von LIGHT defizienten embryonalen Stammzellen	68
	<i>Erzeugung von LIGHT^{+/-} ES Zellen durch homologe Rekombination</i>	68
	<i>Identifizierung korrekt rekombinierter ES-Zell Klone mittels "Screening-PCR"</i>	68
	<i>Southern Blot Analyse der homolog rekombinierten ES Zellen</i>	68
3.3.3	Generierung eines LIGHT defizienten Mausstammes aus rekombinierten ES Zellen	69
3.3.4	Nachweis der erfolgreichen Inaktivierung des <i>light</i> Gens	71
3.4	Analyse des Phänotyps von LIGHT defizienten Mäusen und Zellen	73
3.4.1	Morphologie und Funktion lymphatischer Organe in LIGHT defizienten Mäusen	73
	<i>Histologische Untersuchung sekundärer lymphatischer Organe in LIGHT^{-/-} Mäusen</i>	73
	<i>T Zell abhängige Antikörperantworten in LIGHT defizienten Mäusen</i>	76
3.4.2	Sekundäre lymphatische Organe in LIGHT/LT β doppelt defizienten Mäusen	77
3.4.3	Proliferation von LIGHT defizienten T Zellen <i>in vitro</i>	78
3.4.4	VSV Infektion in LIGHT defizienten Mäusen	81
3.4.5	Listerieninfektion in LIGHT defizienten Mäusen	81
3.4.6	Der Einfluss von LIGHT in der Abstossung von Hauttransplantaten	83
3.4.7	Reifung von LIGHT defizienten Dendritischen Zellen	84
3.4.8	Die allogene MLR in Abwesenheit von LIGHT	85
	<i>CTL Aktivität von LIGHT defizienten Splenozyten</i>	86
	<i>Zytokine im MLR Kultur-Überstand in Abwesenheit von LIGHT</i>	86
	<i>CD4:CD8 Verhältnis von MLR-aktivierten LIGHT defizienten T Zellen</i>	87

4	DISKUSSION	89
4.1	LIGHT in der Organogenese des sekundären lymphatischen Systems.....	89
4.2	LIGHT als kostimulatorisches Molekül bei proliferativen T Zell Antworten <i>in vitro</i>	94
4.3	Die antivirale und antibakterielle Infektionsabwehr in Abwesenheit von LIGHT.....	95
4.4	LIGHT als wichtiger Mediator einer allogenen Transplantatabstossung	96
4.5	Beziehung von biologischer Funktion und chromosomaler Lokalisation von Subgruppen der TNF Liganden Superfamilie	98
4.6	Ausblick.....	100
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	105
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	107
7	DANKSAGUNG.....	125
8	ANHANG.....	127

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1.1: Liganden und Rezeptoren der TNF/Lymphotoxin Familie.....	2
Abb. 1.2: Molekulares Modell des humanen LIGHT.....	4
Abb. 1.3: Struktur der weißen Pulpa der Milz.....	9
Abb. 3.1: Schematische Darstellung der murinen LIGHT cDNS	59
Abb. 3.2: Homologievergleich der murinen und humanen LIGHT Proteine.....	60
Abb. 3.3: Bindung von murinem LIGHT an HVEM und LT β Rezeptor	61
Abb. 3.4: Northern Blot Analyse der LIGHT mRNS Expression in adulten Maus-Geweben und im murinen Embryo	62
Abb. 3.5: Southern Blot Hybridisierung des BAC Klon und muriner genomischer DNS mit einer LIGHT spezifischen Sonde.....	63
Abb. 3.6: Chromosomale Lokalisation von LIGHT	64
Abb. 3.7: Rekombinationsereignisse zwischen den genomischen Loci für LIGHT und I-A	66
Abb. 3.8: Physikalische Ausschnittskarte des murinen Chromosom 17 mit der relativen Lage des <i>light</i> Gens und des MHC Locus.	66
Abb. 3.9: Inaktivierung des <i>light</i> Gens in embryonalen Stammzellen	67
Abb. 3.10: Southern Blot Analyse der in der "Screening PCR" positiven ES Zell Klone nach <i>SpeI</i> -Verdau.....	69
Abb. 3.11: Schematische Darstellung der Generierung gendefizienter Mäuse aus homolog rekombinierten ES Zellen durch Blastozysteninjektion	70
Abb. 3.12: PCR und Southern Blot Analyse von drei Nachkommen aus der LIGHT-heterozygoten Verpaarung.....	71
Abb. 3.13: Abwesenheit von LIGHT mRNS in LIGHT ^{-/-} Splenozyten	72
Abb. 3.14: CD70 mRNS Expression in LIGHT ^{-/-} Splenozyten	72
Abb. 3.15: Immunohistochemische Analyse von Milz-Gefrierschnitten aus LIGHT defizienten und WT Kontroll-Tieren.....	74
Abb. 3.16: Immunohistochemische Analyse von Peyer'schen Plaques und mesenterialen Lymphknoten in LIGHT defizienten Mäusen im Vergleich zu WT Kontrollen	75
Abb. 3.17: Anti-NP Antikörper Antwort nach Immunisierung mit NP ₁₉ -CG	76

Abb. 3.18: Analyse des Mesenteriums von LIGHT ^{+/+} LTβ ^{+/+} , LIGHT ^{-/-} LTβ ^{+/^Δ} , LIGHT ^{+/-} LTβ ^{Δ/Δ} und LIGHT ^{-/-} LTβ ^{Δ/Δ} Mäusen	77
Abb. 3.19: Konfokale lasermikroskopische Analyse der Milz Mikroarchitektur in LIGHT/LTβ doppelt und LTβ Rezeptor defizienten Tieren	78
Abb. 3.20: [³ H]-Thymidineinbau von T Zellen in Abwesenheit von LIGHT.....	79
Abb. 3.21: Zellteilungsaktivität von LIGHT defizienten T Lymphozyten.....	80
Abb. 3.22: Humorale und zelluläre Immunantwort von LIGHT ^{-/-} Mäusen auf eine VSV Infektion	81
Abb. 3.23: Überlebenskinetik und Bakterienzahlen nach <i>L. monocytogenes</i> Infektion.....	82
Abb. 3.24: Hauttransplantat Abstossung in LIGHT ^{-/-} und LIGHT ^{-/-} CD28 ^{-/-} Mäusen.....	83
Abb. 3.25: Aktivierungsmarker auf LIGHT ^{-/-} Knochenmarks-gereiften Dendritischen Zellen	84
Abb. 3.26: Intrazelluläre IL-12 Produktion in Knochenmarks-gereiften Dendritischen Zellen	85
Abb. 3.27: Alloreaktive CTL Antwort von H-2 ^b Effektor Zellen.....	86
Abb. 3.28: Zytokinkonzentrationen in Abwesenheit von LIGHT in einer allogenen MLR.....	87
Abb. 3.29: CD8:CD4 Verhältnis aktivierter Effektor T Zellen in einer allogenen MLR	88
Abb. 4.1: Modell zur Interaktion von fötalen Vorläuferzellen in der Organogenese von Lymphknoten und Peyer'schen Plaques	93
Abb. 4.2: Organisation der Gene der TNF Superfamilie in paralogenen chromosomalen Regionen.....	99
Abb. 4.3: Schematische Darstellung einer gewebespezifisch rekonstituierbaren Gendefizienz.....	102

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1.1: Sekundäre lymphatische Organe in TNF/LT defizienten Mäusen	6
Tabelle 1.2: Sekundäre lymphatische Organe bei Inhibition von TNF/LT Liganden-Rezeptor Interaktionen.....	7
Tabelle 1.3: Kostimulatorische Moleküle der T Zell Aktivierung	11
Tabelle 2.1: Zusammensetzung der Zellkulturmedien	23
Tabelle 2.2: Verwendete Antibiotika.....	24
Tabelle 2.3: Verwendete Bakterienstämme	25
Tabelle 2.4: Verwendete Zellen und Zelllinien	26
Tabelle 2.5: Degenerierte Primer zur Amplifikation eines Teilstücks der murinen LIGHT cDNS.....	27
Tabelle 2.6: Primer zur Durchführung der RACE-PCR	27
Tabelle 2.7: Sequenzierprimer	27
Tabelle 2.8: Primer zur Durchführung verschiedener RT-PCRs	28
Tabelle 2.9: Screening PCR-Primer	28
Tabelle 2.10: Zusätzliche Primer.....	29
Tabelle 2.11: Primer zur Genotypisierung LIGHT defizienter Mäuse	29
Tabelle 2.12: Primer zur Genotypisierung LT β defizienter Mäuse	30
Tabelle 2.13: Primer zur Genotypisierung CD28 defizienter Mäuse	30
Tabelle 2.14: Verwendete Antikörper und Proteinstandards.....	31
Tabelle 2.15: Verwendete Plasmid Ausgangsvektoren.....	33
Tabelle 2.16: Im Rahmen der Arbeit hergestellte Vektoren.....	34
Tabelle 2.17: Standard PCR-Bedingungen.....	42
Tabelle 3.1: LIGHT und MHC Genotypen der Nachkommen aus der Verkreuzung.....	65

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Ag	Antigen	kb	Kilobasenpaare
AK	Antikörper	kDa	Kilodalton
AP	alkalische Phosphatase	LD ₅₀	50%ige letale Dosis
APC	Antigen präsentierende Zelle	LT	Lymphotoxin
bp	Basenpaar(e)	M	Mol
β-ME	β-Merkaptoethanol	MΦ	Makrophage
BAC	bacterial artificial chromosome	MHC	Major Histokompatibilität Komplex
BSA	Rinderserumalbumin	MLR	Mixed lymphocyte reaction
cDNS	DNS-Kopie der mRNS	MZ	Marginalzone
CFU	colony forming unit	min	Minute(n)
CG	Hühnchen γ-Globulin	mRNS	Boten-RNS
cpm	counts per minute	neo	Neomycin Phosphotransferase
CTL	Zytotoxische T Zelle	NP-CG	Nitrophenyl-konjugiertes CG
DC	Dendritische Zelle	PBS	Phosphat-gepuffertes Salz
DEPC	Diethylpyrocarbonat	PCR	Polymerase Kettenreaktion
DMSO	Dimethylsulfoxid	PFU	plaque forming unit
DNS	Desoxyribonukleinsäure	p.g.	post gestationem
dNTP	Desoxyribonukleotide	PMA	4-α-Phorbol 12-Myristat 13-Acetat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	PMSG	pregnant mare serum gonadotropin
EF Zelle	embryonaler Fibroblast	POX	Peroxidase
ERG	Eppendorfreaktionsgefäß	RNS	Ribonukleinsäure
ES Zelle	embryonale Stammzelle	rRNS	ribosomale RNS
EtOH	Ethanol	RT	Raumtemperatur
Fc	Immunglobulin-Fc Teil	SDS	Sodium-Dodecylsulfat
FDC	Follikuläre Dendritische Zelle	SPF	Spezifisch pathogen frei
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung	SSC	Sodiumchlorid-Sodiumcitrat-Lösung
FKS	Fötale Kälberserum	TZR	T Zell Rezeptor
h	Stunde(n)	v/v	Volumen/Volumen
hCG	human chorionic gonadotropin	w/v	Gewicht/Volumen
H ₂ O _{bidest}	2-fach destilliertes Milli-Q-Wasser	w/w	Gewicht/Gewicht
HSV-TK	Herpes Simplex Virus Thymidinkinase	WT	Wildtyp
IL-	Interleukin-	ÜN	über Nacht
i.p.	intraperitoneal	UpM	Umdrehungen pro Minute
i.v.	intravenös	ÜS	Überstand
IPTG	Isopropyl-β-D-1-thiogalactosid	UTR	Untranslatierte Region

1 EINLEITUNG

Als der Tumor Nekrose Faktor (TNF) und Lymphotoxin ($LT\alpha$) vor 30 Jahren identifiziert wurden, charakterisierte man sie unabhängig voneinander als von Makrophagen bzw. Lymphozyten produzierte Faktoren, die spezifische Zelltypen, v.a. Tumor Zellen, lysieren konnten (Carswell et al., 1975; Granger et al., 1969). Erst mit der Klonierung der cDNS für TNF bzw. $LT\alpha$ (Gray et al., 1984; Pennica et al., 1984) erkannte man Ähnlichkeiten zwischen den Molekülen, und es wurde im Laufe der Zeit klar, dass es sich um Mitglieder einer Gen Superfamilie handelte. Auch die Rezeptoren dieser Moleküle sind ihrerseits zu einer TNF Rezeptor Superfamilie zusammenzufassen. Ein erster Hinweis auf das breite Wirkungsspektrum der TNF Liganden und Rezeptoren war 1986 die Entdeckung, dass Kachektin, ein Faktor, der Fieber und das "Wasting Syndrom" verursacht (Pekala et al., 1983), mit TNF identisch ist (Beutler and Cerami, 1986). Heute gehören die TNF Liganden und TNF Rezeptor Superfamilien wohl zu den best charakterisierten Genfamilien mit jeweils über 20 Mitgliedern (Kwon et al., 1999a; Locksley et al., 2001; Smith et al., 1994; Ashkenazi and Dixit, 1998), wobei jedoch vor allem mit Hilfe der weit angelegten humanen und murinen Genom-Sequenzierungs Projekte ständig neue homologe Moleküle gefunden werden. Die meisten TNF Liganden und Rezeptoren sind im Immunsystem exprimiert, wo sie entscheidend an der Koordination von Proliferation und Effektorfunktionen der Pathogen-reaktiven Zellen beteiligt sind. Aber auch für auf den ersten Blick zu diesen so unterschiedliche Funktionen wie Apoptose und Organogenese sind sie verantwortlich.

Die umfangreichen biologischen Wirkungen der TNF Moleküle lassen sich andererseits auch als ursächlich bei humanen Krankheitsbildern wiederfinden und werden gezielt in Therapieversuchen z.B. gegen Arteriosklerose, Osteoporose, Autoimmunkrankheiten, Transplantatabstossung und Krebs eingesetzt. Voraussetzung für das Finden neuer und erfolgreicher Therapieansätze ist die Analyse der *in vivo* Funktion der einzelnen TNF Familienmitglieder, was in eleganter Weise anhand von gendefizienten Mäusen möglich ist.

In dieser Arbeit wurde ein für LIGHT, ein kürzlich identifiziertes Mitglied der TNF Liganden Superfamilie, defizienter Mausstamm generiert und charakterisiert. Die funktionelle Analyse des Phänotyps dieser Mäuse ergibt eine essentielle kostimulatorische Rolle für LIGHT in der Unterstützung der T Zell Aktivierung. In Hinblick auf die Lymphorganogenese kooperiert LIGHT mit $LT\beta$ in der Morphogenese mesenterialer Lymphknoten, was anhand eines Vergleichs von $LT\beta$ einfach defizienten mit LIGHT/ $LT\beta$ doppelt defizienten Mäusen gezeigt wurde.

1.1 LIGHT als Mitglied der TNF Superfamilie

TNF, $LT\alpha$ und $LT\beta$ können, zusammen mit dem kürzlich identifizierten TNF Liganden Superfamilien Mitglied LIGHT (Mauri et al., 1998), zu einer engeren TNF/Lymphotoxin Subfamilie innerhalb der größeren TNF Superfamilie zusammengefasst werden. Das Gegenstück zur Subfamilie der Liganden wird von vier TNF Rezeptor Superfamilien Mitgliedern gebildet: Der TNF Rezeptor p55 (TNFRp55, CD120a),

TNF Rezeptor p75 (TNFRp75, CD120b), LT β Rezeptor und HVEM (Herpes Virus Entry Mediator) besitzen überlappende aber distinkte Ligandenbindungseigenschaften (Abb. 1.1).

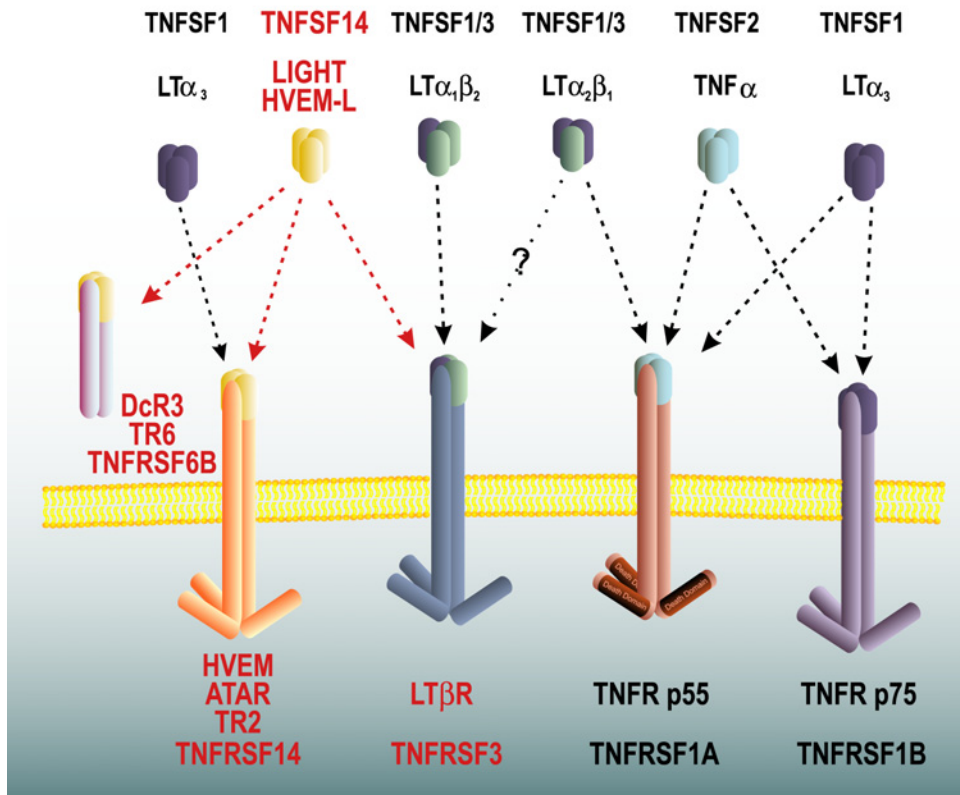


Abb. 1.1: Liganden und Rezeptoren der TNF/Lymphotoxin Familie. Die Interaktionen von Liganden und Rezeptoren der engeren TNF Superfamilie sind durch Pfeile verdeutlicht. Für jedes Molekül sind zu den gebräuchlichen zusätzlich die standardisierten Namen angegeben.

TNF kann nach Stimulation von einer Vielzahl von Zelltypen des Immunsystems exprimiert werden, wie Mastzellen, NK Zellen, Lymphozyten und vor allem Makrophagen, die als Hauptproduzenten angesehen werden. Aber auch für Astrozyten des Gehirns, Epithelzellen der Retina oder Fibroblasten verschiedener Organe ist eine TNF Produktion beschrieben (Aggarwal and Natarajan, 1996). Neben der membranständigen Form existiert TNF auch als lösliches Trimer, das in einem streng regulierten Prozess aktivierungsabhängig durch die Metalloprotease TACE (TNF α converting enzyme) von der Zelloberfläche abgespalten werden kann (Black et al., 1997).

LT α_3 wird ausschliesslich als löslicher Faktor von aktivierten T und B Lymphozyten und von NK Zellen produziert (Paul and Ruddle, 1988). Sowohl TNF α als auch LT α_3 interagieren als Homotrimer mit den TNF Rezeptoren p55 und p75, die ihre Namen aufgrund ihres jeweiligen Molekulargewichts von 55 kDa bzw. 75 kDa erhielten (Lewis et al., 1991; Loetscher et al., 1990; Smith et al., 1990). Beide Rezeptoren werden von allen kernhaltigen Zellen exprimiert und können proteolytisch von der Zelloberfläche abgespalten werden (Ware et al., 1995). Für die löslichen Varianten von TNFRp55 und TNFRp75, die keine Rolle in der intrazellulären Signaltransduktion mehr spielen können, werden zwei mögliche

biologische Funktionen diskutiert. Einerseits könnte so die systemische Bioverfügbarkeit reguliert werden, indem die sezernierten Rezeptoren die TNF und $LT\alpha_3$ Trimere gebunden halten und erst zeitlich und räumlich verzögert wieder für die Interaktion mit membranständigen Rezeptoren zur Verfügung stellen. Andererseits könnte es sich um eine kompetitive Inhibition handeln, bei der die löslichen Rezeptorvarianten die Liganden endgültig aus dem System entfernen (Ware et al., 1995). Dies stünde in Analogie zu Mechanismen, die schon für lösliche TNF Rezeptor Homologe viralen Ursprungs beschrieben sind, wie z.B. crmA-D aus Kuhpocken (Hu et al., 1994; Loparev et al., 1998; Smith et al., 1996) oder MT-2 aus Myxoma Virus (Schreiber et al., 1997).

In Kombination mit $LT\alpha$ tritt das ausschliesslich membranständig vorkommende $LT\beta$ Molekül hauptsächlich in der Form eines $LT\alpha_1\beta_2$ Heterotrimer (Browning et al., 1993; Browning et al., 1995; Ware et al., 1995) auf. $LT\beta$ wird ähnlich wie $LT\alpha$ von peripheren Blutleukozyten produziert. Diese Expression ist aber nicht wie im Fall von $LT\alpha$ auf aktivierte Zellen beschränkt, sondern erstreckt sich auch auf ruhende Zellen.

Das jüngste Mitglied der engeren TNF Familie wurde 1998 erstmals von Mauri *et al.* kloniert und LIGHT benannt, was ein Akronym für "Lymphotoxin homolog which exhibits Inducible expression and competes with the herpes simplex virus Glycoprotein D for binding of HVEM, a receptor expressed by T lymphocytes" darstellt (Mauri et al., 1998). LIGHT (HVEM-L, TNFSF14) ist ein Typ II Transmembranprotein, das von Matrixmetalloproteinasen von der Zelloberfläche abgespalten werden kann (Morel et al., 2000) und bis jetzt nur als Homotrimer (siehe Abb. 1.2) nachgewiesen wurde. Es wird in erster Linie von aktivierten T Zellen (Mauri et al., 1998; Morel et al., 2000) exprimiert, dabei in stärkerem Maße von $CD8^+$ im Vergleich zu $CD4^+$ T Zellen. Neuere Studien zeigen eine LIGHT-Expression auch auf immaturren Dendritischen Zellen (DCs), die nach Maturierung, in diesem Fall durch LPS oder anti-CD40 mAKs induziert, nicht mehr nachzuweisen ist (Tamada et al., 2000a). Im humanen System wurde kürzlich eine alternative Spleiss-Variante für LIGHT definiert, die keine Transmembrandomäne mehr besitzt und zytoplasmatisch lokalisiert ist (Granger et al., 2001). LIGHT kann an drei Rezeptoren mit jeweils sehr spezifischen zellulären Expressionsmustern binden.

Der $LT\beta$ Rezeptor ist auf Follikulären Dendritischen Zellen (FDCs) und stromalen Zellen zu finden (Browning et al., 1997), nicht jedoch auf hämatopoetischen Zellen, mit Ausnahme von Makrophagen (Futterer et al., 1998). Eine lösliche Form, wie für TNFRp55 ist für dieses Molekül bis dato nicht beschrieben worden. Neben LIGHT bindet auch das $LT\alpha_1\beta_2$ -Heterotrimer an diesen Rezeptor (Crowe et al., 1994; Mauri et al., 1998).

HVEM, der zweite für LIGHT definierte Interaktionspartner, kann auch durch $LT\alpha_3$ aktiviert werden. Erstmals kloniert wurde er anhand seiner Eigenschaft, den Eintritt des Herpes Simplex Virus-1 in die Wirtszelle über seine Bindung des viralen Glykoprotein D zu vermitteln, woher auch der Name "Herpes Entry Mediator" stammt (Montgomery et al., 1996). Kurz darauf wurde dasselbe Molekül als neues Mitglied der TNF Rezeptor Superfamilie, entdeckt in Datenbank Sequenzvergleichen, von zwei anderen unabhängigen Gruppen unter den Namen "ATAR" und "TR2" veröffentlicht (Hsu et al., 1997; Kwon et al., 1997). Das zelluläre Expressionsmuster von HVEM ist weitgehend komplementär zu dem des $LT\beta$ Rezeptor und erstreckt sich auf immature Dendritische Zellen (Morel et al., 2000; Salio et al., 1999), T und B Zellen, Natürlichen Killer (NK) Zellen, Monozyten und Endothelzellen (Harrop et al., 1998b; Kwon

et al., 1997; Morel et al., 2000). Interessant ist zudem die Regulation der HVEM Expression in T Zellen nach Aktivierung im Vergleich zur Expression von LIGHT: Nach Aktivierung der T Zelle wird LIGHT exprimiert und bindet an das konstitutiv vorhandene HVEM, was wiederum die Herunterregulation der Rezeptorexpression induziert. HVEM und Ligand sind somit reziprok reguliert (Morel et al., 2000).

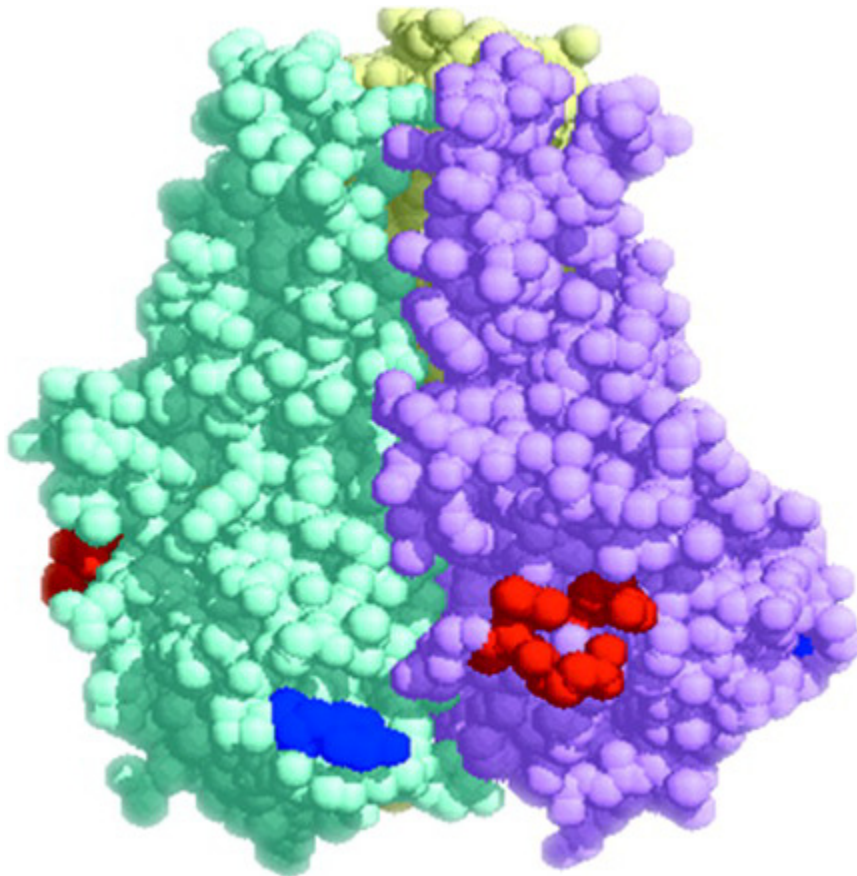


Abb. 1.2: Molekulares Modell des humanen LIGHT. Ein theoretisches LIGHT Modell wurde mittels SwissModel erstellt und umfaßt die Aminosäuren Ser¹⁰³ bis Val²⁴⁰ und damit nur die extrazelluläre C-terminale Domäne. Abgebildet ist hier der putative Rezeptor-bindende Bereich des LIGHT Homotrimeren mit den Positionen der entscheidenden interagierenden Aminosäuren Gln¹¹⁷, Gly¹¹⁹ und Leu¹²⁰ (rot) und Tyr¹⁷³ (blau) (nach Rooney et al., 2000).

Zunächst als neuer "Decoy" Rezeptor für den Fas Ligand wurde 1998 DcR3 (TR6) identifiziert, ein neues Mitglied der TNF Rezeptor Superfamilie, das keine Transmembrandomäne besitzt und nur in sezernierter Form exprimiert wird (Pitti et al., 1998). Erst später zeigte sich, dass DcR3 auch mit hoher Affinität an LIGHT binden kann (Yu et al., 1999) und daher mit dem LT β Rezeptor und HVEM bzw. Fas um die Bindung von LIGHT bzw. Fas Ligand kompetitiert. DcR3 mRNA ist in einer Reihe von normalen humanen Geweben nachgewiesen, wie in Lunge, Magen, Colon, Lymphknoten und Milz. Interessant ist aber die deutlich erhöhte Expression in zahlreichen Karzinomen der Lunge und des Gastrointestinaltraktes (Bai et al., 2000; Pitti et al., 1998). Es wird daher vermutet, dass eine DcR3-Produktion als Abwehrmechanismus des Tumors ein Abfangen von Fas Ligand bewirkt, was wiederum die Fas-vermittelte

Tumorapoptose inhibiert (Green, 1998). Dass nicht nur Fas Ligand sondern auch LIGHT von DcR3 abgefangen werden kann, ist andererseits aber auch als Hinweis auf eine mögliche, evolutorisch konservierte, Rolle von LIGHT in der Tumormunität zu werten.

1.2 Die TNF Superfamilie in der Ontogenese sekundärer lymphatischer Organe

Das Immunsystem kann funktionell unterteilt werden in primäre und sekundäre lymphatische Organe. In primären lymphatischen Geweben, zu denen der Thymus und das Knochenmark zu zählen sind, entwickeln sich die lymphozytären Vorläuferzellen zu immunkompetenten naiven Lymphozyten. Das sekundäre lymphatische System besteht aus Milz, Lymphknoten und den Mukosa-assoziierten lymphatischen Geweben, wie Tonsillen, bronchial assoziierte lymphatische Gewebe, Darm-assoziierte lymphatische Gewebe, Peyer'sche Plaques und andere weniger durchorganisierte Ansammlungen lymphatischer Zellen im Gastrointestinal-, Urogenital- und Respirationstrakt. Diese peripheren lymphatischen Gewebe entstanden im Laufe der Vertebratenevolution an strategisch günstigen Positionen, wo sie die über Epidermis oder Mukosa eindringenden Fremdantigene aufhalten und konzentrieren können. Durch eine spezielle anatomische Mikroarchitektur innerhalb der sekundären lymphatischen Gewebe wird eine äußerst effiziente Interaktion von Antigen-präsentierenden Zellen und T und B Lymphozyten gewährleistet.

Für die Liganden und Rezeptoren der Lymphotoxin/TNF Familie konnten sowohl redundante als auch nicht überlappende biologische Funktionen in der Ontogenese sekundärer lymphatischer Organe definiert werden (Fu and Chaplin, 1999). Hierbei fanden Techniken der gezielten Geninaktivierung in der Keimbahn von Mäusen (Tabelle 1.1) oder die Behandlung mit Rezeptor Fusionsproteinen oder antagonistischen und agonistischen Antikörpern Verwendung (Tabelle 1.2).

Tabelle 1.1: Sekundäre lymphatische Organe in TNF/LT defizienten Mäusen

Genotyp / Behandlung	Milzarchitektur			Peyer'sche Plaques	Lymphknoten	Referenzen
	Marginalzone	T/B Zell Areale	Keimzentren / FDC Netzwerke			
<i>Itβ</i> ^{-/-}	abwesend	vermischt	abwesend	abwesend	alle abwesend	(Futterer et al., 1998)
<i>Itα</i> ^{-/-}	abwesend	vermischt	abwesend	abwesend	abwesend, selten mesenteriale Lymphknoten	(Banks et al., 1995; De Togni et al., 1994)
<i>Itα</i> ^{-/-} <i>tnf</i> ^{-/-}	abwesend	vermischt	abwesend	abwesend	abwesend	(Eugster et al., 1996)
<i>Itβ</i> ^{-/-}	abwesend	B Zellen als Ring um T Zell Areal	abwesend / schwach induzierbar	abwesend	mukosale Lymphknoten vorhanden	(Alimzhanov et al., 1997; Koni et al., 1997; Alexopoulou et al., 1998)
<i>Itβ</i> ^{-/-} <i>tnf</i> ^{-/-}	abwesend	variabel	abwesend	abwesend	mukosale Lymphknoten vorhanden	(Kuprash et al., 1999)
<i>Itα</i> ^{+/-} <i>Itβ</i> ^{+/-}	normal, MZ B Zellen leicht desorganisiert	segregiert	vorhanden	abwesend	alle vorhanden	(Koni and Flavell, 1998)
<i>Itβ</i> ^{-/-} <i>tnfrp55</i> ^{-/-}	n.b. ^a	n.b.	n.b.	abwesend	abwesend	(Koni and Flavell, 1998)
<i>Itβ</i> ^{-/-} <i>tnfrp75</i> ^{-/-}	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	mukosale Lymphknoten vorhanden	(Koni and Flavell, 1998)
<i>tnfrp55</i> ^{-/-}	Marginalsinus abwesend, MZ MΦ und metallophile MΦ reduziert	segregiert	abwesend	reduziert / abwesend	alle vorhanden	(Neumann et al., 1996; Le Hir et al., 1996; Pfeffer et al., 1993; Rothe et al., 1993; Pasparakis et al., 2000)
<i>tnfrp75</i> ^{-/-}	Marginalsinus leicht desorganisiert	segregiert	vorhanden	vorhanden	alle vorhanden	(Erickson et al., 1994; Pasparakis et al., 2000)
<i>tnfrp55</i> ^{-/-} <i>tnfrp75</i> ^{-/-}	Marginalsinus abwesend, MZ MΦ und metallophile MΦ reduziert	segregiert	abwesend	reduziert / abwesend	alle vorhanden	(Ettinger et al., 1996; Pasparakis et al., 2000)
<i>tnf</i> ^{-/-}	Marginalsinus abwesend, MZ MΦ und metallophile MΦ reduziert	segregiert	abwesend	klein	alle vorhanden	(Pasparakis et al., 1996; Marino et al., 1997; Pasparakis et al., 2000; Korner et al., 1997)

^a n.b., nicht beschrieben

Tabelle 1.2: Sekundäre lymphatische Organe bei Inhibition von TNF/LT Liganden-Rezeptor Interaktionen

Genotyp / Behandlung	Milzarchitektur			Peyer'sche Plaques	Lymphknoten	Referenzen
	Marginalzone	T/B Zell Areale	Keimzentren / FDC Netzwerke			
LTβ Rezeptor- Fc Transgen	abwesend	vermischt	abwesend	reduziert / abwesend	vorhanden	(Ettinger et al., 1996)
LTβ Rezeptor- Fc oder anti LTβ mAK <i>in utero</i>	abwesend	vermischt	abwesend	abwesend	mukosale Lymphknoten immer vorhanden, variable Anzahl an peripheren Lymphknoten je nach Behandlungsbeginn	(Rennert et al., 1996; Rennert et al., 1997)
LTβ Rezeptor- Fc oder Anti LTβ mAK <i>in adulter Maus</i>	abwesend	B Zellen als Ring um T Zell Areal	abwesend	vorhanden	vorhanden	(Mackay et al., 1997; Mackay and Browning, 1998)
TNFRp55-Fc Transgen	Marginalsinus fehlt; MZ B Zellen, MZ M Φ und metallophile M Φ vorhanden	B Zellen als Ring um T Zell Areal	abwesend	vorhanden / desorganisiert	alle vorhanden	(Ettinger et al., 1998)
TNFRp55-Fc <i>in utero</i>	Marginalsinus fehlt; metallophile M Φ vorhanden, andere Populationen n.b. ^a .	B Zellen als Ring um T Zell Areal	abwesend	vorhanden	vorhanden	(Rennert et al., 1996)
TNFRp55-Fc <i>in adulter Maus</i>	vorhanden	segregiert	vorhanden	vorhanden	vorhanden	(Mackay et al., 1997; Mackay and Browning, 1998)
TNFRp55-Fc + LTβ Rezeptor- Fc <i>in utero</i>	n.b.	n.b.	abwesend	abwesend	alle abwesend	(Rennert et al., 1998)
<i>Itα</i>^{-/-} mit agonistischem anti LTβ Rezeptor mAK <i>in utero</i>	abwesend	vermischt	abwesend	abwesend	mukosale und periphere, cranial gelegene Lymphknoten anwesend	(Rennert et al., 1998)
<i>Itα</i>^{-/-} mit <i>tnf</i> Transgen	abwesend	B Zellen als Ring um T Zell Areal	reduziert	abwesend	abwesend	(Alexopoulou et al., 1998)

^a n.b., nicht beschrieben

1.2.1 Die TNF/LT Familie in der Organogenese von Lymphknoten und Peyer'schen Plaques

Aus den Untersuchungen an LT α -, LT β - und LT β Rezeptor-defizienten Mausstämmen wurde deutlich, dass vor allem die Interaktion von membranständigem LT $\alpha_1\beta_2$ mit dem LT β Rezeptor für die Genese von Lymphknoten verantwortlich ist. LT β Rezeptor^{-/-} Mäuse besitzen keinerlei Lymphknoten (Futterer et

al., 1998), was auch größtenteils für $LT\alpha^{-/-}$ Tiere zutrifft (Banks et al., 1995; De Togni et al., 1994), wobei in letzteren gelegentlich lymphatische Aggregate im Mesenterium zu beobachten sind (Banks et al., 1995). In $LT\beta$ defizienten Mäusen sind dagegen immer mesenteriale und in einigen Fällen auch sakrale Lymphknoten anzutreffen (Alimzhanov et al., 1997; Koni et al., 1997). Das Auftreten von mesenterialen Lymphknoten in $LT\beta$ defizienten im Vergleich zu deren Abwesenheit in $LT\beta$ Rezeptor defizienten Mäusen, weist auf eine mögliche Rolle von LIGHT, als weiterer Ligand für den $LT\beta$ Rezeptor, in der Organogenese der mukosalen Lymphknoten hin. TNF, TNFRp55 und TNFRp75 sind entbehrlich für die Bildung von Lymphknoten, werden aber benötigt, um Peyer'sche Plaques und Keimzentren zu generieren (Erickson et al., 1994; Korner et al., 1997; Neumann et al., 1996; Pasparakis et al., 1996). Die Behandlung von Mäusen mit TNFRp55- und $LT\beta$ Rezeptor-Fusionsproteinen bestätigte zum einen die Erkenntnisse aus den gendefizienten Mäusen, brachte zudem aber neue Informationen über den zeitlichen Ablauf der Lymphknotenontogenese. Die Fusion der Liganden-Bindungsdomäne an einen Immunglobulin-Fc-Teil führt zur Dimerisierung und zur Stabilisierung des Rezeptor-Fusionsproteins *in vivo*. Stammt der verwendete Fc-Teil von einem Immunglobulin der IgG Subklasse, kann das Fusionsprotein die Plazenta einer schwangeren Maus passieren und die Liganden im sich entwickelnden Embryo neutralisieren (Rennert et al., 1996; Rennert et al., 1997). Wird $LT\beta$ Rezeptor-Fc an Tag 18 p.g. gegeben, werden die Nachkommen mit unveränderter Lymphknotenstruktur aber ohne Peyer'sche Plaques geboren. Bei Fusionsproteingabe an Tag 16 p.g. fehlen Peyer'sche Plaques und popliteale Lymphknoten, während mesenteriale, axilläre und inguinale Lymphknoten erhalten bleiben. Wird $LT\beta$ Rezeptor-Fc an Tag 12 p.g. oder früher verabreicht, ist die Abwesenheit von Peyer'schen Plaques, poplitealer, axillärer und inguinaler Lymphknoten zu beobachten, nur noch mesenteriale und mehrere zervikale, sakrale und lumbare Lymphknoten sind vorhanden. Letztere stellen somit eine enterisch-assoziierte Lymphknotengruppe dar, die früh in der Ontogenese auf ein $LT\beta$ Rezeptor-vermitteltes Signal angewiesen sind.

1.2.2 Die Funktion der LT/TNF Familie in der Ausbildung der Mikroarchitektur der Milz

Für die Morphogenese der Milz sind grundlegend andere Signale verantwortlich als für die Lymphknoten-Ontogenese. Dies ist daraus zu schliessen, dass in Abwesenheit von $LT\alpha$, $LT\beta$ oder $LT\beta$ Rezeptor dramatische Defekte in der Genese von Lymphknoten und Peyer'schen Plaques zu beobachten sind, die Milz jedoch immer erhalten bleibt. Andererseits zeigt sich in *Hox11*-defizienten Mäusen ein isoliertes Fehlen der Milz bei unbeeinträchtigter Lymphknoten- oder Peyer'scher Plaque-Entwicklung (Roberts et al., 1994). Die Ausbildung einer intakten zellulären Mikroarchitektur der Milz liegt wiederum hauptsächlich in der Verantwortung des LT/TNF Systems.

Die Milz kann generell in zwei Hauptkomponenten unterteilt werden, die rote und die weiße Pulpa (siehe Abb. 1.3). Die rote Pulpa ist funktionell ein Blutfilter, der alte oder beschädigte Erythrozyten aus dem Kreislauf entfernt. Hier befinden sich eine größere Population von Makrophagen und variable Zahlen von AK-produzierenden Plasmazellen. Die weiße Pulpa ist ein streng strukturiertes lymphatisches Kompartiment, in dem die antigenabhängige Aktivierung und Differenzierung von B und T Lymphozyten stattfindet. Blut gelangt über die Zentralarteriole in die periarterioläre lymphatische Scheide (PALS), die

hauptsächlich aus T Zellen, aber auch Dendritischen Zellen, die als antigenpräsentierende Zellen dienen, besteht. Die Zentralarteriole durchdringt die PALS und bildet den Marginalsinus, der von MAdCAM-1 (Mucosal Addressin Cell Adhesion Molecule-1)-exprimierenden und PNA (Peanut Agglutinin)-positiven Endothelzellen gesäumt ist. Der Marginalsinus ist von spezialisierten Metallophilen und Marginalzonen Makrophagen umgeben und bildet zusammen mit Marginalzonen B Zellen, die anhand ihres $IgM^{high} IgD^{low}$ Phänotyps zu naiven B Zellen zu zählen sind, die Marginalzone an der Grenze zwischen weißer und roter Pulpa. Eine zweite B Zellpopulation, bestehend aus rezirkulierenden $IgM^{low} IgD^{high}$ B Zellen ist in Form von Follikeln organisiert. Diese Primärfollikel umgeben Aggregate von FDCs, ganz ähnlich der Situation, wie sie in Lymphknoten zu finden ist.

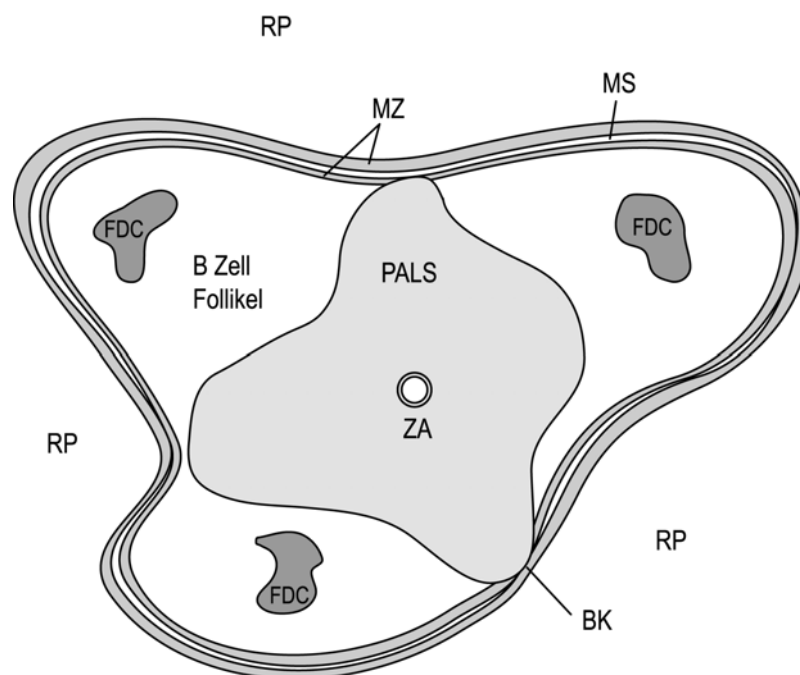


Abb. 1.3: Struktur der weißen Pulpa der Milz. Die weiße Pulpa ist aufgeteilt in ein zentrales T Zell-reiches Areal, der periarteriolären lymphatischen Scheide (PALS), die von B Zell-reichen Primärfollikeln umgeben ist. Innerhalb jedes Follikels befindet sich eine Ansammlung Follikulärer Dendritischer Zellen (FDCs). Die weiße Pulpa wird von der roten Pulpa (RP) durch die Marginalzone (MZ) getrennt, bestehend aus dem MAdCAM-1⁺ Marginalsinus (MS), Marginalzonen B Zellen, Marginalzonen Makrophagen und Metallophilen Makrophagen. Die Brückenkanäle (BK) stellen Bereiche dar, über die Lymphozyten die weiße Pulpa erreichen und verlassen. ZA, Zentralarteriole (nach Fu and Chaplin, 1999).

Auch die Ausbildung einer intakten Milzarchitektur ist, ähnlich der Lymphknoten Organogenese, bei fehlender $LT\alpha_1\beta_2$ - $LT\beta$ Rezeptor Interaktion extrem gestört. In $LT\alpha^{-/-}$ und $LT\beta$ Rezeptor^{-/-} Mäusen ist die T/B Zell Segregation komplett verloren gegangen und die Zentralarteriole ist nicht mehr im T Zell Bereich zu lokalisieren. T und B Zellen sind im Bereich der weißen Pulpa gleichmäßig verteilt, es existieren weder B Zell Follikel noch FDC Netzwerke. Zudem fehlt eine Marginalzone, die normalerweise die rote von der weißen Pulpa trennt (Banks et al., 1995; De Togni et al., 1994; Futterer et al., 1998). Das

Fehlen der Marginalzone ist zwar auch in $LT\beta$ defizienten Tieren wiederzufinden (Alimzhanov et al., 1997; Koni et al., 1997), jedoch ist die Organisation der weißen Pulpa geringfügiger gestört als in $LT\alpha^{-/-}$ und $LT\beta$ Rezeptor $^{-/-}$ Mäusen. T Zellen sind hier noch periarteriolar angeordnet, und B Zellen konzentrieren sich als ringförmiger Wall um die T Zellen und durchmischen sich nicht mit letzteren. In Abwesenheit von TNFRp55 und TNF bleibt die T/B Zellkompartimentalisierung zwar intakt, es kommt aber nicht zur Ausbildung von Marginalsinus, FDC Netzwerken oder Keimzentren (Alimzhanov et al., 1997; Le Hir et al., 1996; Koni et al., 1997; Marino et al., 1997; Neumann et al., 1996; Pasparakis et al., 1996; Pasparakis et al., 2000; Pfeffer et al., 1993; Rothe et al., 1993). Experimente unter Verwendung von $LT\beta$ Rezeptor-Fusionsprotein *in vivo* oder die Generierung von Knochenmarkschimären zeigten, dass nach Population der weißen Pulpa mit Lymphozyten die T/B Zellanordnung relativ fixiert ist. Sind segregierte T/B Zell Bereiche vorhanden, kann dies die Inhibition von $LT\alpha_1\beta_2$ - $LT\beta$ Rezeptor Interaktionen nicht rückgängig machen. Auf der anderen Seite kann eine gestörte T/B Zell Segregation durch kongenitale oder perinatale Abwesenheit der entsprechenden Signale später nicht mehr repariert werden (Fu et al., 1997). Weitaus plastischer ist die Ausbildung von B Zellfollikeln und FDC Netzwerken, die ein kontinuierliches über den $LT\beta$ Rezeptor vermitteltes Signal benötigen um stabil zu bleiben (Fu et al., 1997; Mackay et al., 1997; Mackay and Browning, 1998).

Die Diskrepanzen in den phänotypischen Defekten der sekundären lymphatischen Organe von $LT\alpha^{-/-}$ und $LT\beta$ Rezeptor $^{-/-}$ Mäusen im Vergleich zu $LT\beta^{-/-}$ Mäusen sind bis dato nicht eindeutig erklärbar. Man kann aber auf eine mögliche Rolle von LIGHT- $LT\beta$ Rezeptor oder LIGHT-HVEM Interaktionen in der lymphatischen Organogenese spekulieren.

1.3 TNF Familien Mitglieder als kostimulatorische Moleküle in der T Zell Aktivierung

Die meisten T Zellen des Immunsystems erkennen mit ihrem T Zell Rezeptor (TZR) Antigene (Substanzen, die eine Immunantwort hervorrufen) in der Form von Proteinfragmenten. Diese Fragmente müssen den T Zellen im Kontext von MHC Molekülen auf der Oberfläche eines anderen Zelltyps, der Antigen Präsentierenden Zelle (APC), präsentiert werden. Dieser Erkennungsvorgang reicht aber nicht aus, um eine T Zelle zu aktivieren. Gleichzeitig mit dem T Zell Rezeptor vermittelten Signal muß ein zweites, kostimulatorisches Signal an die T Zelle übermittelt werden, bevor sie proliferieren und eine spezifische Effektorfunktion erfüllen kann, wie die Sekretion von Zytokinen oder die Lyse von Zielzellen. Bisher konzentrierten sich *in vitro* Studien vor allem auf die Rolle von LIGHT als kostimulatorisches Molekül, das T Zellen dieses "zweite Signal" liefert.

Die ersten kostimulatorischen Moleküle, die definiert wurden, waren CD28, als Rezeptormolekül konstitutiv auf T Zellen exprimiert, und seine Liganden CD80 (B7-1) und CD86 (B7-2). CD80 und CD86 können von APCs hochreguliert werden und bewirken über die Bindung an CD28 ein Initiationssignal für die Aktivierung naiver T Zellen. Dies führt zur IL-2 Produktion und verhindert, dass T Zellen apoptotisch oder anergisch werden, was in Abwesenheit eines Zweitsignals eintreten würde (Chambers and Allison, 1997; Lenschow et al., 1996). Die Tatsache dass, jedenfalls im humanen System, nicht alle T Zellen CD28 exprimieren, läßt auf die Existenz weiterer kostimulatorischer Signalwege schliessen. Tatsächlich

wurden gerade in jüngster Zeit zahlreiche neue Moleküle mit kostimulatorischen Eigenschaften auf T Zellen und APCs entdeckt und charakterisiert.

Tabelle 1.3: Kostimulatorische Moleküle der T Zell Aktivierung

Molekül Familie	Rezeptor	Liganden	Beschreibung
Ig Superfamilie	CD28	B7-1 und B7-2	IL-2 Produktion, Schutz vor Apoptose und Anergie
	CTLA-4	B7-1 und B7-2	Negativer Regulator
	ICOS	B7RP-1 (B7h)	ICOS nur auf aktivierten T Zellen, IL-10 und IgE Produktion
	SLAM (CDw150)	SLAM	IFN γ Produktion, Aktivierung T Gedächtniszellen v.a. in Richtung Th1/Th0
Integrin Superfamilie	LFA-1 (CD11a/CD18)	ICAM-1, -2, -3 (Ig Superfamilie)	Adhäsion und Reorganisation des Zytoskeletts, Verstärkung von Signal 1
TNF Superfamilie	4-1BB (CD137)	4-1BB-L	Späte Phase der Immunantwort, Überleben von aktivierten CD8 ⁺ aber auch CD4 ⁺ T Zellen
	OX40 (CD134)	OX40-L	Erstaktivierung, Effektor- und Gedächtnisphase von CD4 ⁺ T Zellen
	CD27	CD27-L	notwendig für effektive Sekundärantwort

Wie aus Tabelle 1.3 zu ersehen, sind auch für Mitglieder der TNF Superfamilie kostimulatorische Funktionen in der T Zell Aktivierung bereits etabliert (Watts and DeBenedette, 1999). Beispiele hierfür sind CD27/CD27-L, OX40/OX40-Ligand und 4-1BB/4-1BB-Ligand.

4-1BB wird vor allem auf aktivierten CD4⁺ und CD8⁺ T Zellen exprimiert, sein Ligand, 4-1BB-L von muren Dendritischen Zellen und nur in geringem Maß von aktivierten B Zellen und Makrophagen (DeBenedette et al., 1997; Vinay and Kwon, 1998). *In vitro* wurde eine Beteiligung von 4-1BB/4-1BB-Ligand an primären (Gramaglia et al., 2000a) und sekundären (DeBenedette et al., 1995; Hurtado et al., 1997; Kim et al., 1998) CD4 (Chu et al., 1997; Hurtado et al., 1997; Kim et al., 1998) und CD8 (Guinn et al., 1999; Melero et al., 1998; Tan et al., 1999; Tan et al., 2000) T Zell Antworten nachgewiesen. Vor allem in der späten Phase der Immunantwort spielt 4-1BB eine Rolle beim Überleben der aktivierten T Zellen (Cannons et al., 2001). Mit Hilfe 4-1BB-L defizienter Mäuse wurde eine Beteiligung dieses kostimulatorischen Moleküls bei der Generierung einer CTL Antwort nach Influenza Virus Infektion und bei der Transplantatabstossung nachgewiesen (DeBenedette et al., 1999).

Analog zu 4-1BB wird auch OX40 von aktivierten CD4⁺ und CD8⁺ T Zellen exprimiert (al Shamkhani et al., 1996; Calderhead et al., 1993). OX40-Ligand ist durch CD40-Ligation auf B Lymphozyten und Dendritischen Zellen induzierbar (Weinberg et al., 1998), wurde aber auch auf einer MHC II⁺ B7-1⁺ CD11b⁺ Zellpopulation im Gehirn von Mäusen mit experimenteller autoimmuner Enzephalitis nachgewiesen (Weinberg et al., 1999). Kreuzvernetzung von OX40 auf T Zellen führt zur Proliferation und Zytokinproduktion *in vitro* (Gramaglia et al., 1998; Rogers and Croft, 2000). *In vivo* führt ein OX40-vermitteltes Signal zu Expansion und Überleben naiver T Zellen mittels Inhibition peripherer Deletion (Maxwell et al., 2000; Gramaglia et al., 2000b). OX40^{-/-} und OX40-L^{-/-} Mäuse zeigen einen Defekt in der

T Helferzellproliferation und eine erniedrigte Produktion von IFN γ aber auch IL-4 und IL-5 (Gramaglia et al., 2000b; Murata et al., 2000). Ausserdem ist die Induktion einer effektiven allogegenen CTL Antwort in OX40-L^{-/-} Mäusen inhibiert.

Bei dem dritten kostimulatorischen Molekülpaar, das hier beschrieben wird, handelt es sich um CD27/CD27-L. Dies ist von besonderem Interesse, da CD27-L (CD70) im Menschen zusammen mit LIGHT im selben Genlokus liegt (Granger et al., 2001), woraus nicht nur eine molekulare sondern auch eine funktionelle Verwandtschaft ableitbar sein könnte. Die Mehrheit naiver peripherer CD4⁺ und CD8⁺ T Zellen zeigt eine CD27 Expression, die nach TZR Stimulation erhöht wird (Gravestain et al., 1995; Hintzen et al., 1994a; van Lier et al., 1987), aber auch B Zellen und NK Zellen exprimieren diesen Rezeptor. Die Herunterregulation von CD27 ist irreversibel und scheint ein terminales Stadium der T Zell Differenzierung zu charakterisieren (Gravestain et al., 1995; Hamann et al., 1997). CD27 Ligand ist nach Antigen Rezeptor Stimulation transient in T und B Zellen hochreguliert und zeigt somit einen zeitlich nicht weit zurückliegenden Antigenkontakt an (Lens et al., 1998; Oshima et al., 1998). Daneben wurde CD70 auch auf Dendritischen Zellen im Thymus und nach Infektion in Lymphknoten gefunden (Akiba et al., 2000; Hintzen et al., 1994b). Informationen über die in *vivo* Funktion von CD27/CD27-L stammen hauptsächlich aus der Charakterisierung der CD27^{-/-} Maus (Hendriks et al., 2000), in der gezeigt wurde, dass CD27 für ein Aufrechterhalten einer Antigen-spezifischen CD4⁺ und CD8⁺ T Zell Immunität im Rahmen einer Gedächtnisantwort benötigt wird.

1.4 Bisherige Studien über LIGHT

LIGHT wurde 1998 im Zuge der Suche nach Liganden für HVEM kloniert, für den bis dahin nur das virale Glykoprotein D des Herpes Simplex Virus-1 als Interaktionspartner bekannt war (Mauri et al., 1998). Kurz darauf wurde von einer zweiten unabhängigen Arbeitsgruppe dasselbe Protein als HVEM-Ligand veröffentlicht und gezeigt, dass es in einer allogegenen MLR die Proliferation stimuliert und zur NF- κ B Translokation führt (Harrop et al., 1998a).

Als eine der ersten definierten biologischen Funktionen wurde eine durch LIGHT induzierte Apoptose von Tumorzellen veröffentlicht, die durch Serumentzug und in Gegenwart von IFN γ verstärkt wurde (Zhai et al., 1998). Die in dieser Studie beschriebene Voraussetzung, dass die Tumorzelle sowohl LT β Rezeptor als auch HVEM exprimieren muss, um für die LIGHT/IFN γ vermittelte Apoptose suszeptibel zu sein, wurde von Rooney *et al.* in Frage gestellt. Hier wurde mittels selektiver Antikörperblockade von LT β Rezeptor oder HVEM auf Tumorzellen gezeigt, dass ausschliesslich der LT β Rezeptor über TRAF3 Rekrutierung für die Induktion der Apoptose verantwortlich ist (Rooney et al., 2000). In der Aufklärung der intrazellulären Signaltransduktionsmechanismen der LIGHT/IFN γ induzierten Apoptose war zunächst der Befund überraschend, dass Bcl-2 hier proapoptotisch wirkte. Bcl-2 gilt als eines der wichtigsten antiapoptotischen Regulatorproteine, das über Inhibition der für die Aktivierung von Caspasen notwendigen Adaptorproteine die Zelle vor dem programmierten Zelltod schützt. LIGHT und IFN γ agieren allerdings synergistisch in der Aktivierung von Caspase-3, die Bcl-2 von einer antiapoptotischen in eine proapoptotische Form umwandelt. LIGHT antagonisiert somit die protektiven Funktionen von

Bcl-2 und induziert Zelltod, woran ausserdem die Generierung freier Radikale in einem der Caspase-3 Aktivierung vorgelagerten Schritt entscheidend mitbeteiligt ist (Chen et al., 2000).

Das Hauptaugenmerk der bisherigen Studien über LIGHT lag auf seiner kostimulatorischen Funktion in der Aktivierung von T Zellen. *In vitro* führt überexprimiertes oder exogen zugegebenes LIGHT in CD28 unabhängiger Weise zur verstärkten Proliferation von T Zellen und zur IFN γ und GM-CSF Produktion (Tamada et al., 2000b; Tamada et al., 2000a). LIGHT-überexprimierende Tumore werden von Wildtyp Mäusen stärker abgestossen im Vergleich zu untransfizierten Kontrolltumoren, und die Gabe von LT β Rezeptor Fusionsprotein führt zu reduzierten T Zell Antworten in einem "graft versus host disease" Modell. Im letzteren Fall kann aber eine Rolle von LT $\alpha_1\beta_2$ nicht ausgeschlossen werden, da dieser Ligand ebenso wie LIGHT durch das Fusionsprotein blockiert wird (Tamada et al., 2000b).

Dass LIGHT auch bei der Reifung von Dendritischen Zellen eine Rolle spielen kann, wurde kürzlich von Morel *et al.* gezeigt. Die Inkubation von immaturren Dendritischen Zellen mit LIGHT-transfizierten Stimulatorzellen führt zur verstärkten Expression von Aktivierungsmarkern wie CD86 oder MHC II und zu einer erniedrigten Makropinozytose Aktivität, beides Kennzeichen einer DC Maturierung. Durch gleichzeitige Stimulation mit CD154 (CD40-L) werden diese Effekte synergistisch verstärkt und es kommt zu einer im Vergleich zur Stimulation mit CD154 alleine signifikant erhöhten Produktion von IL-6, IL-12 und TNF α (Morel et al., 2001).

Bisher wurden zwei transgene Mausstämme beschrieben, die LIGHT konstitutiv unter dem proximalen *lck*- bzw. dem *cd2*-Promotor exprimieren. Wird die Transkription vom proximalen *lck*-Promotor kontrolliert, führt dies zu einer konstitutiven LIGHT Expression auf allen T Lymphozyten – im Vergleich zur streng regulierten endogenen LIGHT Produktion also zu einer deutlichen Überexpression. Diese LIGHT transgenen Mäuse weisen ein deutlich vergrössertes T Zellkompartiment mit hyperaktivierten peripheren T Lymphozyten auf, charakterisiert durch die Aktivierungsmarker CD69, CD44 und CD62L. Es entwickelt sich spontan eine Autoimmunerkrankung gekennzeichnet durch Splenomegalie, Lymphadenopathie, Glomerulonephritis, erhöhte Autoantikörpertiter und lymphozytäre Infiltrate in verschiedenen peripheren Geweben (Wang et al., 2001b). Anhand desselben Mausstammes konnte auch gezeigt werden, dass LIGHT an der Aufrechterhaltung der zentralen Toleranz beteiligt ist. Der Thymus dieser Mäuse zeigt starke Atrophie mit einer reduzierten Zahl von CD4⁺ CD8⁺ doppelt positiven Thymozyten. Dies liegt begründet in einer deutlich erhöhten Apoptoserate dieser Zellpopulation und legt den Verdacht nahe, dass LIGHT immature T Zellen *in vivo* deletieren kann und somit an der negativen Selektion im Thymus beteiligt sein könnte (Wang et al., 2001a). Die Analyse der LIGHT *cd2*-Promotor transgenen Mäuse ergab einen etwas anderen Phänotyp, was wahrscheinlich die Unterschiede in der Zellspezifität der beiden Promotoren widerspiegelt. CD2 ist auf T Zellen aber auch einigen B Zellen exprimiert, während *lck* ausschliesslich in Thymozyten und peripheren T Zellen aktiv ist. Transgene Mäuse, die LIGHT unter dem *cd2* Promotor exprimieren, zeigen ein selektiv in der Lamina propria expandiertes B Zellkompartiment mit erhöhten IgA Serumtitern, während in Milz und Lymphknoten die B Zellzahlen im Vergleich zu nicht-transgenen Kontrolltieren stark erniedrigt sind. Zudem sind diese Tiere steril aufgrund atrophierter Fortpflanzungsorgane (Shaikh et al., 2001). Die Anomalien der lymphatischen Organe, wie Thymusatrophie, Splenomegalie, Lymphadenopathie und ein starke intestinale In-

flammation, verursacht durch drastisch expandierte CD4⁺ und CD8⁺ $\alpha\beta$ T Zellzahlen, sind vergleichbar mit LIGHT *lck*-Promotor transgenen Tieren.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Die biologischen Funktionen des neuen TNF Familienmitglieds LIGHT sind besonders *in vivo* noch unzureichend untersucht. Von besonderem Interesse ist zunächst eine mögliche Beteiligung an der Ontogenese der sekundären lymphatischen Organe. Die bis dato existierenden Mausmodelle reichen nicht aus, um die Organogenese besonders der mukosalen Lymphknoten und der Milzmikroarchitektur schlüssig zu klären. Auch die Untersuchung der Rolle von LIGHT in der kostimulatorischen T Zellaktivierung erfolgte ausschliesslich durch *in vitro* Experimente und anhand von transgenen Mausmodellen. Während die Überexpression eines Genprodukts unter einem spezifischen Promotor in einem transgenen Mausmodell eine sehr artifizielle pathologische Situation simuliert, erlaubt die Geninaktivierung in der Maus die Untersuchung der Auswirkungen eines fehlenden Gens auf den Gesamtorganismus und damit die Beleuchtung der Situation von einem hierzu komplementären Ausgangspunkt aus.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, zunächst das murine Ortholog des humanen LIGHT zu klonieren und den LIGHT Genloкус in der Maus zu charakterisieren. Zur Aufklärung der *in vivo* Funktion von LIGHT sollte das Gen in der Maus durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen inaktiviert und der so generierte LIGHT defiziente Mausstamm phänotypisch analysiert werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Bezugsquellennachweis

2.1.1 Chemikalien

Chemikalie	Bezugsquelle
AEC (3-Amino-9-Ethylcarabzol)	Sigma, Taufkirchen
Agarose	GibcoBRL, Eggenstein
Antikörper	Bekton-Pharmingen, Hamburg
Ammoniumchlorid	Merck, Darmstadt
Ampicillin Natriumsalz	Sigma, Taufkirchen
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Sigma, Taufkirchen
Bactoagar	Difco Labs, Detroit, USA
Borsäure	Sigma, Taufkirchen
Bromphenolblau	Sigma, Taufkirchen
BSA (Rinderserumalbumin, RIA Qualität)	Sigma, Taufkirchen
Calcium Ionophor	Sigma, Taufkirchen
CFSE	Molecular Probes, USA
Chloramphenicol	Sigma, Taufkirchen
Chloroform	Merck, Darmstadt
Concavalin A	Pharmacia, Schweden
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma, Taufkirchen
Desoxynukleotide (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
DMEM Medium	GibcoBRL, Eggenstein
EDTA	Sigma, Taufkirchen
Eosin Y	Sigma, Taufkirchen
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
FKS (Fötales Kälberserum)	GibcoBRL, Eggenstein
	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Formamid	Sigma, Taufkirchen
Formaldehyd (37 %)	Merck, Darmstadt
Gancyclovir (Cymeven)	Syntex
Geneticin (G418)	GibcoBRL, Eggenstein
L-Glutamin	Biochrom, Berlin
Glyzerin	Sigma, Taufkirchen
Glyceringelatine	Sigma, Taufkirchen
Guanidiniumthiocyanat	Fluka, Ulm
Harnstoff (Urea)	GibcoBRL, Eggenstein
Hämatoxilin, Pulver	Aldrich, Steinheim

Hefeextrakt	Difco Labs, USA
HEPES Puffer, 1M	GibcoBRL, Eggenstein
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
IPTG	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Kanamycin	Sigma, Taufkirchen
Kristallviolett	Sigma, Taufkirchen
Marker 1kb DNS-Leiter	GibcoBRL, Eggenstein
2-Methylbutan	Sigma, Taufkirchen
Methylenblau	Sigma, Taufkirchen
Mineralöl	Sigma, Taufkirchen
Mitomycin C	Sigma Taufkirchen
MOPS (3-[N-Morpholino] Propansulfonsäure)	Sigma Taufkirchen
Natriumacetat-Trihydrat	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Sigma, Taufkirchen
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
N,N'-Dimethylformamid	Merck, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin
Phenol Rotipuran®	Roth, Karlsruhe
PMA (4- α -Phorbol 12-Myristat 13-Acetat)	Sigma, Taufkirchen
p-Nitrophenyl-Phosphat	Sigma, Taufkirchen
RPMI Medium	Biochrom, Berlin
Salzsäure	Sigma, Taufkirchen
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Roth, Karlsruhe
TEMED (N,N,N,N'- Tetraethylmethyldiamin)	Serva, Heidelberg
Thioglykollat	Difco Labs, USA
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Riedel de Haen, Seelze
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Trypanblau Lösung (0,4%)	Sigma, Taufkirchen
Trypsin/EDTA	Biochrom, Berlin
Trypton	Difco Labs, USA
Tween 20	Sigma, Taufkirchen
Wasser für die Chromatographie	Merck, Darmstadt
X- Gal (X-Galaktopyranosid)	GibcoBRL, Eggenstein
Xylencyanol	Sigma, Taufkirchen
Ziege-Normal Serum	Dianova, Hamburg

2.1.2 Radiochemikalien

5'-[α -³²P]-dCTP redivue, spezifische Aktivität ~3000Ci/mmol

[Methyl-³H] Thymidin, spezifische Aktivität 5.0 Ci/mmol

⁵¹Cr als Na₂⁵¹CrO₄, 35mCi/ml

Die Reagenzien wurde von der Firma Amersham (Braunschweig) bezogen und vor Ablauf der ersten Halbwertszeit verwendet.

2.1.3 Enzyme

Enzym	Bezugsquelle
Alkalische Phosphatase	BioLabs, New England, USA
cDNS Synthese Kit	GibcoBRL, Eggenstein
DNS T4 Ligase	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
DNS Polymerase Klenowfragment	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
DNS Taq-Polymerase	GibcoBRL, Eggenstein
DNS Pfu-Polymerase	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Pronase E	Sigma, Taufkirchen
Proteinase K	Sigma, Taufkirchen
Restriktionsenzyme	BioLabs, New England Roche Diagnostics GmbH, Mannheim GibcoBRL, Eggenstein
RNase A	Sigma, Taufkirchen

2.1.4 Reagenzien und Verbrauchsmaterial

Reagenzien	Bezugsquelle
AP Substrat Kit III	Vector Labs, USA
Avidin/Biotin-Block Kit	Vector Labs, USA
Cryomold® Gewebeschaln	Miles Inc., USA
Deckgläser	Roth, Karlsruhe
Einbettmedium für Gefrierschnitte	Leica Instruments, Nussloch
Filme	Hyperfilm™-MP, Amersham, Braunschweig X-OMAT (XAR-5) Kodak, München
Filterpapier Whatman 3MM	Schultheiss, München
Fluoromount-G	Southern Biotechnology Associates Inc., USA
Haematoxylin (Gil #3)	Sigma, Taufkirchen
Marathon-ready RACE-PCR-Kit	Clontech, USA
NucTrap® Sonden-Aufreinigungssäulen	Stratagene, Heidelberg
Nylonmembran, Gene Screen Plus	NEN® Research Products, USA
Objektträger Super-Frost® Plus	Menzel-Gläser, Braunschweig
Parafilm M	American National Can™, USA
Plastikwaren	NUNC, Wiesbaden Falcon, USA Corning, USA
QIAGEN Plasmid Isolierungskits	QIAGEN, Hilden
Quantikine Zytokin ELISA Kits	R&D Systems, USA
Rediprime DNA labelling system	Amersham, Braunschweig
Sterilfilter	Sartorius, Göttingen
TA Cloning® Kit	Invitrogen, Niederlande
Zellsieb (70µm)	Falcon, USA

2.1.5 Geräte

Gerät	Hersteller
β-Counter	Matrix™ 96, Packard, USA
Brutschrank	Cytoperm, Heraeus, Hanau
Elektrophorese von DNS und RNS	Agargel Maxi/Midi, Biometra, Göttingen
Elektroporations Gerät	Gene Pulser, Bio-Rad, München
ELISA reader und Auswerte Software	Emax precision microplate reader mit SoftMaxPro Software, Molecular Devices, Ismaning
ELISA Waschgerät	SkanWasher 400, Skatron Instruments, UK
FACS Gerät und AuswerteSoftware	FACScalibur und CellQuest, Becton Dickinson, USA
γ-Counter	Cobra® II Auto Gamma Reader, Packard, USA
Geldokumentationssystem	Eagle EYE II, Stratagene, Heidelberg
Kryotom	Jung CM3000, Leica, Nussloch
Kühlzentrifugen	Sorvall® RC 26 PLUS, Heraeus, Hanau Megafuge 1,0, Heraeus, Hanau Rotor 2250 mit Mikrotiterschaukeln Omnifuge 2,0 RS, Heraeus, Hanau
Mikroskope	ID 03, Zeiss, Jena DMBRE, Leica, Bensheim MZ APO mit JVC KY-F70 Digital Kamera, Leica, Bensheim LSM 510, Zeiss, Jena
PCR Maschinen	Trio-Thermoblock, Biometra, Göttingen GeneAmp 9600, Perkin Elmer, USA
Phosphoimager	Storm 840, Molecular Dynamics, USA
Photometer	LKB Biochrom Ultrospec Plus, Pharmacia, Schweden
Spannungsquelle	Power Pack P25, Biometra, Göttingen PS 500 XT, HIS, USA
Sterilbank	HLB 2472 GS, Heraeus, Hanau
Tischzentrifugen	Zentrifuge 5415 C, Eppendorf, Hamburg Biofuge 15, Heraeus, Hanau Biofuge 15 R, Heraeus, Hanau
Ultra-Turrax	Ultra-Turrax T25, IKA Labortechnik, Staufen
UV-Crosslinker	UV Stratalinker® 2400, Stratagene, Heidelberg
Zell-Harvester	Micro 96 Harvester, Skatron Instruments, UK

2.2 Medien und Puffer

2.2.1 Stammlösungen und Puffer

Stammlösung oder Puffer	Zusammensetzung	
PBS	13,7 mM 2,7 mM 80,9 mM 1,5 mM	NaCl KCl Na ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄ pH 7,4
Lösung I (Alkalische Lyse)	50 mM 25 mM 10 mM	Glukose Tris EDTA
Lösung II (Alkalische Lyse)	0,2 N 1 % (w/v)	NaOH SDS
Lösung III (Alkalische Lyse)	60,0 % (w/v) 11,5 % (v/v) 28,5 % (v/v)	Kaliumacetat Eisessig H ₂ O _{bidest}
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	50 % (v/v) 48 % (v/v) 2 % (v/v)	Phenol, pH = 8,0 Chloroform Isoamylalkohol
TE-Puffer	10 mM 1 mM	Tris, pH = 8,0 EDTA, pH = 8,0
TNE	10 mM 100 mM 1 mM	Tris, pH = 8,0 NaCl EDTA, pH = 8,0
Proteinase K	10 mg/ml	Proteinase K in H ₂ O _{bidest} gelöst
Pronase E	10 mg/ml 10 mM 10 mM	Pronase E (10mg/ml) Tris, pH = 8,0 NaCl Selbstverdau 1h bei 37°C

Verdaulösung	500 µl	TNE
	50 µl	SDS 10 %
	7,5 µl	Proteinase K
	25 µl	Pronase E
TAE Elektrophoresepuffer	40 mM	Tris, pH = 8,0
	20 mM	Eisessig
	2 mM	EDTA
6 x DNS-Auftragspuffer	15 %	Ficoll Typ 400
	0,05 %	Bromphenolblau
	0,05 %	Xylencyanol
RNS-Elektrophoresepuffer	1 x	MOPS
2 x RNS Auftragspuffer	48,0 % (v/v)	Formamid
	10,0 % (v/v)	10 x MOPS
	17,3 % (v/v)	Formaldehyd
	14,0 % (v/v)	DEPC-H ₂ O
	5,3 % (v/v)	Glyzerin
	5,3 % (v/v)	Bromphenolblau
10 x MOPS-Puffer	0,4 M	MOPS
	0,1 M	Natriumacetat·3·H ₂ O
	10 mM	EDTA·Na ₂ ·2·H ₂ O
		pH = 7,2
Methylenblau Färbelösung	0,5 M	NaAc pH = 4,8
	0,04 % (w/v)	Methylenblau
50 x Denhardts	1 % (w/v)	Polyvinylpyrollidon
	1 % (w/v)	Ficoll
	1 % (w/v)	BSA
20 x SSC	3 M	NaCl
	0,3 M	Trinatriumcitrat
20 x SSPE	3 M	NaCl
	0,2 M	NaH ₂ PO ₄
	0,02 M	EDTA
		pH = 7,4
50 x TAE	2 M	Tris, pH = 8,0
	1 M	Eisessig
	0,1 M	EDTA

10 x TBE	1 M	Tris, pH = 7,5
	1 M	Borsäure
	0,01 M	EDTA
Hybridisierungslösung (Southern)	5 % (w/v)	Dextransulfat
	0,5 % (w/v)	SDS
	0,03 % (w/v)	NaCl
Waschlösung I (Southern)	2 x	SSC
	0,1 % (w/v)	SDS
Waschlösung II (Southern)	0,2 x	SSC
	0,1 % (w/v)	SDS
Hybridisierungslösung (Northern)	50 % (v/v)	Formamid
	5 x	SSPE
	5 x	Denhardts
	1 % (w/v)	SDS
	10 % (w/v)	Dextransulfat
Waschlösung I (Northern)	2 x	SSPE
Waschlösung II (Northern)	2 x	SSPE
	2 % (w/v)	SDS
Waschlösung III (Northern)	0,1 x	SSPE
dNTP-Mix	1 mM	dATP
	1 mM	dCTP
	1 mM	dTTP
	1 mM	dGTP
10x PCR-Puffer:	500 mM	KCl
	100 mM	Tris-HCl, pH = 8,3
	15, 20, 25 mM	MgCl ₂
	0,1 % (w/v)	Gelatine
Erythrozyten-Lysepuffer:	155 mM	NH ₄ Cl
	10 % (v/v)	Tris-HCl, pH = 7,65 pH = 7,2
Kristallviolett Lösung:	0,5 % (w/v)	Kristallviolett
	5 % (v/v)	Formaldehyd
	50 % (v/v)	EtOH
	4,25 % (w/v)	NaCl

FACS Färbepuffer	1 x	PBS
	0,5 % (w/v)	BSA
	0,01 % (w/v)	NaN ₃
Carbonatpuffer (ELISA)	5 mM	Na ₂ CO ₃
	45 mM	NaHCO ₃
		pH = 9,0
Wash Buffer (ELISA)	1 x	PBS
	0,1 % (v/v)	Tween 20
ELISA Block	1 % (w/v)	BSA
Konjugatpuffer (ELISA)	1x	PBS
	0,01 % (w/v)	BSA
	0,01 % (w/v)	CaCl ₂
	0,01 % (w/v)	MgCl ₂
	2 mM	β-ME
Substratbuffer	97 g	Diethanolamin
	0,1 g	MgCl ₂ ·H ₂ O
	0,02 %	NaN ₃
	1,0 l	H ₂ O
		pH = 9,5

2.2.2 Medien für die Bakterienkultur

Zur Kultivierung von *E. coli* wurde ausschliesslich durch Autoklavieren (121°C/2 bar/20 min) sterilisiertes Luria-Bertani (LB) Vollmedium verwendet.

Medium	Zusammensetzung
LB	Caseinhydrolysat 10 g
	Hefeextrakt 5 g
	NaCl 5 g
	H ₂ O _{bidest} ad 1 l
	pH = 7,2

Das Festmedium entsteht durch Zugabe von 12 g Bactoagar pro Liter vor dem Autoklavieren. Die Anzucht der Bakterien erfolgte aerob bei 37°C. Flüssigkulturen wurden im Schüttelkolben inkubiert.

Die Organismen wurden auf Festmedium mehrere Wochen bei 4°C aufbewahrt, wobei ein Verschluß der Petrischalen durch Parafilm Austrocknung und Kontamination verhinderte. Zur Langzeitkonservierung wurden über Nacht gewachsene Klone mit 50 % sterilem Glycerin gemischt und anschliessend bei -80°C aufbewahrt.

Die Gewinnung der Bakterien aus Flüssigmedium erfolgte durch Abzentrifugieren bei 5000 UpM.

2.2.3 Medien für die Zellkultur

Tabelle 2.1: Zusammensetzung der Zellkulturmedien

	Zelltypen						
	ES	EF	CHO	P815, BHK, Vero, MC57G	EL-4	Splenozyten	DC
Grundmedium	DMEM	DMEM	RPMI	DMEM	RPMI	RPMI	RPMI
Zusätze							
FKS	15 %	5 %	10 %	5 %	10 %	5 %	5 %
LIF*	1 %						
GM-CSF#							10%
L-Glutamin	2 mM	2 mM		2 mM			
Penicillin	100 U/ml	100 U/ml	100 U/ml	100 U/ml	100 U/ml	100 U/ml	100 U/ml
Streptomycin	100 µg/ml	100 µg/ml	100 µg/ml	100 µg/ml	100 µg/ml	100 µg/ml	100 µg/ml
β-ME	0,05 mM	0,05 mM	0,05 mM	0,05 mM	0,05 mM	0,05 mM	0,05 mM
HEPES						10 mM	10 mM
Behandlung							
Mitomycin C		10 µg/ml für 2 h					

*LIF wurde als Kulturüberstand des LIF produzierenden Klons CHO-LIF-D zugesetzt

#GM-CSF wurde als Kulturüberstand des GM-CSF produzierenden Klons X63Ag8-653 zugesetzt (Karasuyama and Melchers, 1988).

2.3 Hemm- und Zusatzstoffe

2.3.1 Antibiotika

Zur positiven Selektion plasmidhaltiger Bakterien wurde dem Kulturmedium Ampicillin, Kanamycin oder Chloramphenicol beigefügt.

Tabelle 2.2: Verwendete Antibiotika

	Stammlösung	Endkonzentration
Ampicillin	50 mg/ml in H ₂ O _{bidest} , sterilfiltriert	100 µg/ml
Kanamycin	50 mg/ml in H ₂ O _{bidest} , sterilfiltriert	100 µg/ml
Chloramphenicol	12,5 µg/µl in EtOH	12,5 µg/ml

2.3.2 X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galaktopyranosid)

Zur Blau-Weiß Selektion von Transformanten wurde X-Gal als Analogon des natürlichen Substrats der β-Galaktosidase etwa 20-30 min vor Verwendung auf die Agarplatten ausplattiert.

Voraussetzung für eine Blau-Weiß Selektion ist die Verwendung von Bakterienstämmen, die eine Deletion im *lacZ* Gen besitzen. Durch α-Komplementation mit dem *lacZ*α-Fragment können plasmidhaltige Bakterien eine aktive β-Galaktosidase bilden und so das Substrat X-Gal hydrolysieren. Das dabei gebildete 5-Brom-4-chlorindoxyl oxidiert an Luft spontan zu dem Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlorindigo, der Klone mit leerem Vektor blau färbt. Klone, die zusätzlich eine Insertion im α-Fragment besitzen, sind weiß.

	Stammlösung	Endkonzentration
X-Gal	20 mg/ml in N,N'-Dimethylformamid gelöst, Lagerung bei -20°C im Dunkeln	1 mg/Agarplatte

2.3.3 IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalaktosid)

Bei Verwendung von Bakterienstämmen, die den *lac*-Repressor überexprimieren, wurde den Festmedien IPTG als Induktor der β -Galaktosidase zugesetzt, um farbliche Insertionsselektion zu ermöglichen.

	Stammlösung	Endkonzentration
IPTG	0,1 M in H ₂ O bidest, Aliquotlagerung (sterilfiltriert) bei -20°C	5 mM/Agarplatte

2.4 Bakterienstämme, Zelllinien und Versuchstiere

2.4.1 Bakterienstämme

In Tabelle 2.3 sind die im Labor verwendeten Bakterienstämme für Klonierungszwecke oder Infektionsexperimente unter Angabe des Genotyps und der Referenz aufgelistet.

Tabelle 2.3: Verwendete Bakterienstämme

Bakterienstamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> XL1-blue	endA1, hsdR17, thi-1, supE44, recA1, relA1, gyrA96, Δ (lac), (F ^{proAB}), lacIqZ Δ M15, Tn10 (TetR)	Stratagene
<i>E. coli</i> DH5 α	supE44, Δ lacU169, (Φ 80lacZ Δ M15), hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1	(Hanahan, 1983)
<i>L. monocytogenes</i>	fakultativ intrazellulär replizierendes Bakterium	ATCC Stamm 43251

2.4.2 Zellen und Zelllinien

Die in dieser Arbeit verwendeten Zellen und Zelllinien sind in Tabelle 2.4 aufgelistet.

Tabelle 2.4: Verwendete Zellen und Zelllinien

Zelllinie	Herkunft	Referenz
CHO	Chinesischer Hamster, Ovarialkarzinom Zelllinie	(Puck, 1958)
BHK	Syrischer Goldhamster, Nieren Fibroblasten Zelllinie	(Macpherson and Stoker, 1962)
Vero	Afrikanische Meerkatze, Nieren Epithelial-Zelllinie	(Vanderzant and Splittstoesser, 1996)
MC57G	Maus, C57BL/6, Fibrosarcom Zelllinie	ATCC Numme CRL-2295
EL4	Maus, C57BL/6, T Zell Lymphom Zelllinie	ATCC Nummer TIB-39
P815	Maus, DAB/2, Mastozytom Zelllinie	ATCC Nummer TIB-64
Splenozyten	Primäre Milzzellen, kultiviert nach Organhomogenisierung und Erythrozytenlyse	
DC	Kultivierung aus Knochenmarksvorläuferzellen mit GM-CSF	(Inaba et al., 1992)
EF Zellen	embryonale Fibroblasten am Tag 14.5 postcoitum aus CD1 Embryonen	(Wurst and Joyner, 1993)
ES Zellen E14.1	embryonale Stammzellen aus dem Mausstamm 129/Ola gewonnen	(Wurst and Joyner, 1993)

2.4.3 Versuchstiere

Alle Mäuse wurden im spezifisch pathogenfreien (SPF) Bereich des Instituts für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der Technischen Universität in München gezüchtet und gehalten. Als Blastozystenspender dienten C57BL/6 Mäuse, als Ammenmütter (C57BL/6 x BALB/c) F1 Tiere. Die LIGHT Mutation wurde auf den C57BL/6 Stamm mindestens 3-fach rückgekreuzt ausgehend von (C57BL/6 x 129/Ola) F1 LIGHT^{+/-} Tieren. Resultierende heterozygote Mäuse wurden untereinander verpaart, um C57BL/6 LIGHT^{-/-} des MHC Haplotyps H-2^b zu erhalten.

Die verwendeten LTβ Rezeptor^{-/-} Mäuse (Futterer et al., 1998) waren mindestens 6-fach auf den C57BL/6 kongenen Hintergrund rückgekreuzt, wo sie als homozygot defiziente Zucht vermehrt wurden.

Zur Generierung von LIGHT defizienten Mäusen auf einem H-2^d Hintergrund wurden C57BL/6 LIGHT^{+/-} Mäuse einmalig mit BALB/c Tieren rückgekreuzt und heterozygote Nachkommen untereinander verpaart. Daraus resultierende Tiere wurden mittels FACS-Analyse (Färbung für H-2D^d und I-A^d für MHC Klasse I bzw. II) auf den H-2^d Haplotyp auf beiden Allelen überprüft und hinsichtlich der LIGHT-Mutation genotypisiert.

Für die Kreuzungen mit LT β defizienten (Alimzhanov et al., 1997) bzw. CD28 defizienten (Shahinian et al., 1993) Tieren wurden homozygote LIGHT^{-/-} Mäuse mit kongenem C57BL/6 genetischem Hintergrund (2- bzw. mindestens 4-fach rückgekreuzt) verwendet.

2.5 Primer und Antikörper

Alle in diesem Kapitel aufgeführten Primer wurden von der Firma TIB Molbiol (Berlin) oder Metabion (Martinsried) bezogen. Die in Tabelle 2.5, Tabelle 2.6 und Tabelle 2.7 angegebenen Primer wurden für die Amplifikation eines Teilstücks der murinen LIGHT cDNS, für RACE-PCR Reaktionen und für Sequenzierreaktionen eingesetzt.

Tabelle 2.5: Degenerierte Primer zur Amplifikation eines Teilstücks der murinen LIGHT cDNS

Primername	Sequenz* (5'→3')	Verwendung
LIGHT1 s deg	GTN AAY CCN GCN GCN CAY YTN ACN GGN GCN	mLIGHT Charakterisierung
LIGHT2 as deg	YTC NCC NGC YTC NAR RTG NAC NAC NCC NCC	mLIGHT Charakterisierung

* Abkürzungen für degenerierte Basen (IUB Code): R: A/G (Purine), Y: C/T (Pyrimidine), N: A/T/C/G

Tabelle 2.6: Primer zur Durchführung der RACE-PCR

Primername	Sequenz (5'→3')	Verwendung
AP1 (Clontech)	CCA TCC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC	Race-PCR
AP2 (Clontech)	ACT CAC TAT AGG GCT CGA GCG GC	Race-PCR
GSP 3' LIGHT	CCT CTG TTA CGG GAG ACA CGA CTT GGC C	Race-PCR
GSP 5' LIGHT	CCA CAG GGT GAC CGC CGA CTG AGG AGC	Race-PCR
NGSP 3' LIGHT	GAC GTA TCA TGA TGG GGC CCT GGT GAC	Race-PCR
NGSP 5' LIGHT	CTA ACT CCT TCG GGT AGC GGG ATG TGC G	Race-PCR

Tabelle 2.7: Sequenzierprimer

Primername	Sequenz (5'→3')	Verwendung
T7	GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C	Sequenzierung
T3	AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG	Sequenzierung
M13 reverse	CAG GAA ACA GCT ATG AC	Sequenzierung

Für die Detektion verschiedener muriner cDNS Fragmente wurden in Tabelle 2.8 aufgeführte Primer verwendet.

Tabelle 2.8: Primer zur Durchführung verschiedener RT-PCRs

Primername	Sequenz (5'→3')	Verwendung
mLIGHT expr se	GGA ATT CAT GGA GAG TGT GGT ACA GCC TTC	RT-PCR für LIGHT
mLIGHT expr as	CCT CTA GAG ACC ATG AAA GCT CCG AAA TAG	RT-PCR für LIGHT
TNF se	GAC AAG CCT GTA GCC CAC GTC GTA G	RT-PCR für TNF
TNF as	ACA CCC ATT CCC TTC ACA GAG CAA T	RT-PCR für TNF
p120101	TGC TGT TGG TTT CAT TGT AGC G	RT-PCR für CD27-L
p120102	ATC CTG GAG TTG TGG TCA AGG G	RT-PCR für CD27-L
β-Actin se	ATG GAT GAC GAT ATC GCT	RT-PCR für β-Actin
β-Actin as	ATG AGG TAG TCT GTC AGG T	RT-PCR für β-Actin

In Tabelle 2.9 sind die Primer aufgelistet, die in der sogenannten "Screening PCR" zum Nachweis der homologen Rekombination des LIGHT-Rekombinationsvektors in ES Zellen eingesetzt wurden.

Tabelle 2.9: Screening PCR-Primer

Primername	Sequenz (5'→3')	Verwendung
pneo1	GAC GTA AAC TCC TCT TCA GAC	Screening PCR
screen kA se	GTT GGA TTC CTG GAG TTG ATG	Screening PCR
screen kA as	GCC TAC ACC TCC GGG ATC AGC	Screening PCR

In Tabelle 2.10 sind eine Vielzahl von Primern aufgelistet, die in PCR- und Sequenzierreaktionen zur Charakterisierung des genomischen Lokus von mLIGHT zum Einsatz kamen. Weitere Primer wurden für Amplifikation des mLIGHT ORFs und des mTNF ORFs, zur Klonierung der entsprechenden Expressionsvektoren und zur Klonierung und Kontrollsequenzierung des LIGHT-Rekombinationsvektors herangezogen.

Tabelle 2.10: Zusätzliche Primer

Primername	Sequenz (5'→3')	Verwendung
LIGHTgenS1	ATG GAG AGT TGT GTA CAG CC	LIGHT Gen-Lokus Charakterisierung
LIGHTgenS2	GCA GCA GCA CCA GGG CCA GG	LIGHT Gen-Lokus Charakterisierung
LIGHTgenS3	AGC CCC TCA AGA AGG CCA GG	LIGHT Gen-Lokus Charakterisierung
LIGHTgenS4	GTC AGT CGG CGG TCA CCC TG	LIGHT Gen-Lokus Charakterisierung
mLIGHT Spel se	CAG CAT GTA TGT GGA ACA CCT C	LIGHT Gen-Lokus Charakterisierung
mLIGHT Spel as	GGG ATG TTT GGT AAG GAC ATG C	LIGHT Gen-Lokus Charakterisierung
mLIGHT expr se	GGA ATT CAT GGA GAG TGT GGT ACA GCC TTC	ORF-PCR zur Klonierung von LIGHT-pcDNA3
mLas exp neu	CCT CTA GAC CAT GAA AGC TCC GAA ATA GG	ORF-PCR zur Klonierung von LIGHT-pcDNA3
TNFa se exp	GGA ATT CAT GAG CAC AGA AAG CAT GAT CCG	ORF-PCR zur Klonierung von TNF-pcDNA3
TNFa as exp	CCT CTA GAT CAC AGA GCA ATG ACT CCA AAG	ORF-PCR zur Klonierung von TNF-pcDNA3
kArm se	CCG CTC GAG CAT ATA AAG ACA CAG ATG CGG	Klonierung des LIGHT-Rekombinationsvektors
kArm as	CTT GGG TAC CCC TTG CCC CCC	Klonierung des LIGHT-Rekombinationsvektors
laA se	GGT ACG TGA GGA AAG GGG AGG	Sequenzierung des LIGHT-Rekombinationsvektors
laA as	GAA TCC CAG ACA CTG GAA ATC	Sequenzierung des LIGHT-Rekombinationsvektors

Die verwendeten Primer zur Genotypisierung der LIGHT-, LTβ- und CD28-defizienten Mäuse sind in Tabelle 2.11, Tabelle 2.12 und Tabelle 2.13 aufgelistet. Das Primerpaar mLIGHT type1/mLIGHT type2 ist spezifisch für das LIGHT WT-Allel und ergibt ein PCR-Produkt von 500 bp; das Primerpaar mLIGHT type1/pneo1 ist spezifisch für das KO-Allel und ergibt ein PCR-Produkt von 290 bp.

Tabelle 2.11: Primer zur Genotypisierung LIGHT defizienter Mäuse

Primername	Sequenz (5'→3')	Verwendung
mLIGHT type1	ACG CAT GTG TCC TGC GTG TGG	Typisierungs PCR
mLIGHT type 2	CGA CAG ACA TGC CAG GAA TGG	Typisierungs PCR
pneo1	GAC GTA AAC TCC TCT TCA GAC	Typisierungs PCR

Das Primerpaar gtype1/gtype2 ist spezifisch für das LT β WT-Allel und ergibt ein PCR-Produkt von 340 bp; das Primerpaar gtype1/gtype3 ist spezifisch für das KO-Allel und ergibt ein PCR-Produkt von 210 bp.

Tabelle 2.12: Primer zur Genotypisierung LT β defizienter Mäuse

Primername	Sequenz (5'→3')	Verwendung
gtype1	CGG GTC TCC GAC CTA GAG ATC	Typisierungs PCR
gtype2	CCA CAA CAG GTG TGA CTG TCT C	Typisierungs PCR
gtype3	GAG GTG GGT GGA TTG GAA AGA G	Typisierungs PCR

Das Primerpaar 979-54/979-55 ist spezifisch für das CD28 WT-Allel und ergibt ein PCR-Produkt von 600 bp; das Primerpaar 979-54/HSV-TK ist spezifisch für das KO-Allel und ergibt ein PCR-Produkt von 700 bp.

Tabelle 2.13: Primer zur Genotypisierung CD28 defizienter Mäuse

Primername	Sequenz (5'→3')	Verwendung
979-54	CCT GAG TCC TGA TCT GTC AGA CT	Typisierungs PCR
979-55	CTG CTT GTG GTA GAT AGC AAC GA	Typisierungs PCR
HSV-TK	ATT CGC CAA TGA CAA GAC GCTGG	Typisierungs PCR

2.5.1 Antikörper und Protein Standards

In Tabelle 2.14 sind Antikörper und Protein Standards aufgeführt, die bei FACS-Färbungen, Immunhistochemie, ELISAs und der *in vitro* Stimulation von Zellen zum Einsatz kamen.

Tabelle 2.14: Verwendete Antikörper und Proteinstandards

Antikörper	Klon/Spezies	Verwendung	Quelle
Anti-Maus B220-FITC	RA3-6B2/Ratte	Histochemie/FACS	BD PharMingen
Anti-Maus B7-1-FITC	16-10A1/armenischer Hamster	FACS	BD PharMingen
Anti-Maus B7-2-FITC	GL1/Ratte	FACS	BD PharMingen
Anti-Maus CD11b	M1/70/Ratte	Histochemie/FACS	BD PharMingen
Anti-Maus CD11c-biotin	HL3/armenischer Hamster	Histochemie/FACS	BD PharMingen
Anti-Maus CD21/35	7G6/Ratte	Histochemie	BD PharMingen
Anti-Maus CD3 ϵ	145-2C11/armenischer Hamster	<i>in vitro</i> Stimulation	BD PharMingen
Anti-Maus CD3 ϵ -biotin	145-2C11/armenischer Hamster	Histochemie/FACS	BD PharMingen
Anti-Maus CD4	GK1.5/Ratte	Histochemie	BD PharMingen
Anti-Maus CD4-biotin	RM4-5/Ratte	FACS	BD PharMingen
Anti-Maus CD4-FITC	RM4-5/Ratte	FACS	BD PharMingen
Anti-Maus CD40-FITC	3/23/Ratte	FACS	BD PharMingen
Anti-Maus CD8	53672/Ratte	Histochemie	BD PharMingen
Anti-Maus CD8-biotin	53672/Ratte	FACS	BD PharMingen
Anti-Maus CD8-PE	53-6.7/Ratte	FACS	BD PharMingen
Anti-Maus ER-TR9	ER-TR9/Ratte	Histochemie	Dianova
Anti-Maus FDC-M2	209/Ratte	Histochemie	(Kosco-Vilbois et al., 1997)
Anti-Maus I-A ^b -PE	AF6-120.1/Maus (BALB/c)	FACS	BD PharMingen
Anti-Maus I-A ^d -FITC	AMS-32.1/Maus (SJL)	FACS	BD PharMingen
Anti-Maus IgD	11-26c.2/Ratte	Histochemie	BD PharMingen
Anti-Maus IgG1-AP	A85-3/Ratte	ELISA	BD PharMingen
Anti-Maus IgG2a-AP	R19-15/Ratte	ELISA	BD PharMingen
Anti-Maus IgG2b-AP	R12-3/Ratte	ELISA	BD PharMingen
Anti-Maus IgG3-AP	R40-82/Ratte	ELISA	BD PharMingen
Anti-Maus IgM	R6-60.2/Ratte	FACS	BD PharMingen
Anti-Maus IgM-AP	R6-60.2/Ratte	ELISA	BD PharMingen
Anti-Maus H-2D ^b -PE	KH95/Maus (BALB/c)	FACS	BD PharMingen
Anti-Maus H-2D ^d -FITC	34-2-12/Maus (C3H/HeJ)	FACS	BD PharMingen

Anti-Maus H-2K ^b -FITC	AF6-88.5/Maus (BALB/c)	FACS	BD PharMingen
Anti-Maus H-2K ^b /H-2D ^b -biotin	28-8-6/Maus (C3H)	FACS	BD PharMingen
Anti-Maus H-2K ^d -FITC	SF1-1.1/Maus (SJL)	FACS	BD PharMingen
Anti-Maus MHC Klasse II-PE	M5/114.15.2/Ratte	FACS	BD PharMingen
Anti-Maus MAdCAM-1	MECA-367/Ratte	Histochemie	BD PharMingen
Anti-Maus MOMA-1	MOMA-1/Ratte	Histochemie	Dianova
Anti-Maus Sialoadhesin	Ser3D6/Ratte	Histochemie	(Crocker and Gordon, 1986)
Anti-Maus Thy1.2-biotin	30H12/Ratte	FACS	BD PharMingen
Anti-NP	B1-8 μ /Maus IgM	ELISA	K. Rajewsky, Köln
Anti-NP	N1G9/Maus IgG1	ELISA	K. Rajewsky, Köln
Anti-NP	S43-10/Maus IgG2a	ELISA	K. Rajewsky, Köln
Anti-NP	D3-13F1/Maus IgG2b	ELISA	K. Rajewsky, Köln
Anti-NP	S24/63/63/Maus IgG3	ELISA	K. Rajewsky, Köln
Anti Kaninchen IgG-PE	Polyclonal/Esel	FACS	Dianova
Anti-Ratte IgG	Polyclonal/Maus	Histochemie	Dianova
Extravidin-POX		Histochemie	Sigma
Fc-Block CD16/32	2.4G2/Ratte	FACS	BD PharMingen
Anti-Ratte-POX	Ratte IgG (H+L)/Maus	Histochemie	Dianova
PNA		Histochemie	Vector Labs
Streptavidin-Cy5		FACS	Dianova
Streptavidin-PE		Histochemie	BD PharMingen
Streptavidin-PerCP		FACS	BD PharMingen

2.6 Plasmidvektoren

2.6.1 Ausgangsvektoren

Für die Klonierung und Expression von DNS-Sequenzen wurden verschiedene, z.T. kommerziell erhältliche Ausgangsvektoren verwendet.

Tabelle 2.15: Verwendete Plasmid Ausgangsvektoren

Name	Eigenschaften	Referenz
pBluescript II KS +	AmpR, KanR, f1 ori, Col E1 ori, lac-Promotor, lacZ α -Fragment, rop-	Stratagene
pCR II-TOPO	Vektoren zur direkten Klonierung von PCR Produkten AmpR, KanR, f1 ori, Col E1 ori, lac-Promoter, lacZ α -Fragment	Invitrogen
pBS loxP-neo-loxP	pGK Neo poly A mit flankierenden loxP Sequenzen in pBluescript Vektor	K. Pfeffer, München
pGEM7 TK	enthält die Thymidinkinase aus Herplex Simplex Virus, pGEM7 Derivat mit flankierenden NotI-Schnittstellen	K. Pfeffer, München
pcDNA3	Expressionsvektor, CMV-Promotor, AmpR, NeoR	Invitrogen

2.6.2 Im Rahmen der Arbeit hergestellte Vektoren

Tabelle 2.16: Im Rahmen der Arbeit hergestellte Vektoren

Name	Insert	Eigenschaften
5' mLIGHT in pCR II-TOPO	NGSP5'/AP2 LIGHT RACE Produkt	5' Bereich der LIGHT cDNS
3' mLIGHT in pCR II-TOPO	NGSP3'/AP1 LIGHT RACE Produkt	3' Bereich der LIGHT cDNS
mLIGHT ORF in pcDNA3	PCR-Produkt mLIGHT expr se/mLas exp neu	für LIGHT/Rezeptor Bindungsstudien, Sonde für Northern Blot
MTNF ORF in pcDNA3	PCR-Produkt TNFa se/as exp	für LIGHT/Rezeptor Bindungsstudien. Sonde für Northern Blot
SpeI 4,0 kb in pBlue	4,0 kb <i>SpeI</i> -Fragment des mLIGHT-BAC Inserts	genomischer LIGHT BAC Subklon, Sonde für FISH
SpeI 5,8 kb in pBlue	5,8 kb <i>SpeI</i> -Fragment des mLIGHT-BAC Inserts	genomischer LIGHT BAC Subklon, Sonde für FISH
LIGHT KO-Konstrukt in pBlue	<i>KpnI</i> -kurzer Arm/neo/langer Arm/HSV-TK-NotI	LIGHT-Rekombinationsvektor
LIGHT KO PCR Sonde in pCR II-TOPO	PCR-Produkt screen kA se/as	Sonde für LIGHT-Screening PCR
LIGHT 3' flanking probe	1,4 kb <i>SpeI-KpnI</i> Fragment aus SpeI 5,8 kb in pBlue	3'-Flankierende Sonde des rekombinierten genomischen LIGHT-Lokus
neo probe	1,6 kb <i>SpeI-KpnI</i> Fragment aus pBS loxP-neo-loxP in pBlue	Neo Sonde

2.7 Molekularbiologische Arbeitsmethoden

2.7.1 Isolierung von Plasmid-DNS

Alkalische Lyse

Die Alkalische Lyse (Birnboim and Doly, 1979) wurde dazu benutzt, um viele Klone durch geeignete Restriktionsanalysen gleichzeitig genetisch zu überprüfen. Die Bakterien werden unter denaturierenden Bedingungen für RNS, DNS und Proteine durch SDS in Gegenwart von NaOH in der Kälte lysiert. Die anschließende Neutralisation führt zur Kopräzipitation von SDS, chromosomaler DNS und Proteinen. Die Plasmid-DNS renaturiert und verbleibt in Lösung, aus der sie durch Ethanolfällung gewonnen werden kann. Alle Lösungen sind in Kapitel 2.2.1 aufgeführt.

Durchführung:

- zu untersuchende Klone in 2 ml LB unter Selektionsdruck ÜN wachsen lassen
- 1,5 ml in einem Eppendorfreaktionsgefäß (ERG) abzentrifugieren (6000 UpM/1 min)
- Zellen in 100 µl Lösung I vollständig resuspendieren und für 5 min bei RT inkubieren
- 200 µl Lösung II zugeben, vorsichtig mischen und 5 min auf Eis inkubieren
- durch Zugabe von 150 µl Lösung III neutralisieren, wiederum vorsichtig mischen und 5 min auf Eis inkubieren
- 10 min bei 14000 UpM zentrifugieren
- Überstand (ÜS) abheben und verbleibende Proteine durch Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol Extraktion entfernen
- Plasmid DNS mit 2 Volumen EtOH_{abs.} fällen (-20°C/10 min)
- Pelletieren (14000 UpM/10 min)
- DNS-Pellet mit 1 ml 70 % EtOH waschen und in der Vakuumpzentrifuge trocknen
- Pellet in 20 µl TE mit 20 µg/ml RNase A lösen

Für eine anschließende Restriktionsanalyse, wird die mit der Plasmid-DNS zusammen isolierte RNS durch RNase Zugabe zerstört.

Qiagen Kits

Die Plasmid-DNS Isolierung erfolgte mit Hilfe von Qiagen Kits, um besonders reine DNS für Klonierungszwecke und für Sequenzierreaktionen zu erhalten. Je nach benötigter DNS-Menge wurden Mini- Midi- oder Maxi-Säulchen verwendet. Die DNS Isolierung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

2.7.2 Isolierung von chromosomaler DNS

Aus Proteinase verdauten Mausschwanz-Biopsien oder ES Zellen wird die genomische DNS nach Abtrennung von Proteinen und Festbestandteilen direkt durch Ausspinnen gewonnen.

Durchführung:

- Schwanzprobe (ca. 0,4 cm) in ein ERG geben und in der Verdaulösung ÜN (siehe Kapitel 2.2.1) in einem Überkopfrührer bei 37°C inkubieren, um Proteine zu verdauen
- durch Zentrifugieren (14000 UpM/2 min) alle festen Bestandteile abtrennen, den Überstand in ein neues ERG überführen
- ein Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (siehe Kapitel 2.2.1) zugeben und kurz vortexen

- Zentrifugieren (14000 UpM/5 min) und Überstand mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze vorsichtig abnehmen
- zwei Volumen kalten EtOH_{abs.} zugeben und mehrmals schwenken
- DNS mit Pipettenspitze ausspinnen, mit 70 % EtOH waschen und erneut zentrifugieren (14000 UpM/5 min)
- Pellet an der Luft oder in der Vakuumzentrifuge trocknen
- Pellet in 100 µl bei 37°C ca. 1 h lösen
- gelöste chromosomale DNS bei 4°C lagern

2.7.3 Agarosegelelektrophorese

Analytische Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ist eine Standardmethode, die zur Auftrennung von DNS-Fragmenten verwendet wird. Im elektrischen Feld wandern die negativ geladenen Nukleinsäuren zur Anode. Hierbei erfolgt im Agarosegel eine Auftrennung der Fragmente nach ihrer Größe, wobei die Migrationsgeschwindigkeit dem Logarithmus des Molekulargewichtes invers proportional ist. Durch die Verwendung von Ethidiumbromid in der Gelmischung fluoreszieren die Banden bei Bestrahlung mit UV-Licht. Das Muster kann dadurch auch photographisch festgehalten und analysiert werden.

Durchführung:

- 0,8 - 2 % (w/v) Agarose in TAE-Puffer aufkochen bis eine klare homogene Lösung entsteht
- nach Abkühlen auf Handwärme Ethidiumbromid (4 µg/ml) zugeben, dann in eine Gelwanne mit den gewünschten Kämmen gießen und verfestigen lassen
- die Gelwanne mit dem erstarrten Gel in eine Elektrophorese Apparatur einsetzen und mit TAE-Puffer überschichten
- DNS-Proben 1:5 mit Auftragspuffer mischen und in die Geltaschen pipettieren
- die Elektrophorese wird je nach Gelgröße bei 80-150 Volt durchgeführt
- das in die doppelsträngige DNS eingelagerte Ethidiumbromid fluoresziert bei UV-Bestrahlung (Transilluminator, 280 nm) und das Bandenmuster kann photographisch dokumentiert werden
- für eine Auswertung der Bandenmuster mittels Computerprogrammen (Adobe Photoshop™ 5.0) wurden die Daten zusätzlich auf Diskette festgehalten.

Präparative Agarosegelelektrophorese

Zu präparativen Zwecken wurden mehrere Taschen der Kämme abgeklebt, um größere DNS-Mengen auftragen zu können. Anschliessend wurde die Gelelektrophorese (s.o.) durchgeführt. Die gewünschten Banden im Gel wurden unter langwelliger UV-Beleuchtung (325 nm) ausgeschnitten. Aus dem isolierten Gelstück wurde die DNS mittels eines QIAquick Gel Extraction Kits (QIAGEN) gewonnen. Die Vorgehensweise entsprach der dem Kit beiliegenden Anleitung des Herstellers.

Bestimmung von Fragmentgrößen

Durch einen internen Standard im Gel kann die Größe der DNS-Moleküle und gegebenenfalls auch deren Konzentration bestimmt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die 1 kb-Leiter der Firma GibcoBRL (Eggenstein) verwendet.

Fragmentgrößen der 1 kb-Leiter (bp):

12216, 11198, 10180, 9162, 8144, 7126, 6108, 5090, 4072, 3054, 2036, 1636, 1018, 517/506, 396, 344, 298, 220, 154/134, 75

2.7.4 Enzymatische Behandlung von DNS

Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen vom Typ II erkennen spezifisch palindromische Erkennungssequenzen von vier bis acht Basenpaaren doppelsträngiger DNS. Sie hydrolysieren die Phosphodiesterbindung beider Stränge, wobei DNS-Moleküle mit definierten Enden entstehen, die sich zu Klonierzwecken eignen. Die durch Restriktionsverdau erhaltenen DNS-Fragmente wurden auch als Sonden verwendet, um spezifische Sequenzen durch Hybridisierung zu identifizieren (siehe Kapitel 2.7.7). Für den Totalverdau von DNS wurden 2-5 Einheiten Enzym pro μg Plasmid-DNS und bis zu 10 Einheiten Enzym pro μg genomischer DNS eingesetzt.

Allgemeiner Ansatz:	DNS-Lösung	x μl
	10 x Reaktionspuffer	2 μl
	Enzym	2-5 Einheiten/ μg DNS
	H ₂ O _{bidest}	ad 20 μl

Die Menge des eingesetzten Enzyms sollte 10 % des Reaktionsvolumens nicht überschreiten, da zu hohe Glycerinmengen die Reaktion beeinträchtigen können.

Klenowbehandlung von DNS

Das Klenowfragment entsteht durch proteolytische Spaltung der DNS-Polymerase I aus *E. coli*. Es entspricht dem C-terminalen Teil der Polymerase I und besitzt die 5'→3'-Polymeraseaktivität sowie die 3'→5'-Exonukleaseaktivität. Dadurch kann es sowohl überstehende 5'-Enden als auch überstehende 3'-Enden in glatte Enden verwandeln und eignet sich daher zur Modifikation von DNS-Molekülen mit inkompatiblen Enden, die miteinander verknüpft werden sollen. Nach einem vollständigen Restriktionsverdau wurden dem Ansatz zwei Einheiten Klenowenzym und 10 pmol Desoxynukleotide (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) hinzugefügt. Anschliessend wurde für zwei weitere Stunden bei 37°C inkubiert

Dephosphorylierung von DNS

Um eine Selbstligation des Vektors mit kompatiblen Enden zu vermeiden und eine intermolekulare Ligation zwischen Vektor und DNS-Fragment zu begünstigen, wurden die 5'-Enden des Vektors mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Nach dem Restriktionsverdau, bzw. der Linearisierung des Vektors, wurde dem Ansatz eine Einheit Alkalische Phosphatase zugegeben und dieser weiterhin bei 37°C mindestens eine Stunde inkubiert. Um bei der anschliessenden Ligation störende Enzymaktivität zu vermeiden, wurde das Enzym für 10 min bei 65°C inaktiviert und durch Phenol/Chloroform Extraktion von der DNS abgetrennt.

2.7.5 Ligation von DNS-Molekülen

Die DNS-Ligase des Bakteriophagen T4 katalysiert die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen einem 5'-Phosphat und einem 3'-Hydroxylende linearer DNS-Moleküle. Sie vermag sowohl überstehende Enden als auch glatte Enden miteinander zu verknüpfen.

Durchführung:

- Vektor und DNS-Insert im molaren Verhältnis 1:3 mischen
- 2 µl 10-fach Inkubationspuffer und 1-2 Einheiten T4-DNS-Ligase hinzufügen
- mit H₂O_{bidest} ad 20 µl auffüllen
- Inkubation bei 16°C ÜN

TA Cloning®Kit

Bei Klonierungen von PCR-Produkten in die Vektoren pCR II und pCR II-TOPO (siehe Kapitel 2.6.1) wird die Eigenschaft thermostabiler DNS-Polymerasen, an alle doppelsträngigen DNS-Moleküle ein Desoxyadenosin an deren 3'-Ende anzufügen, ausgenützt. PCR-Produkte können so direkt in die Vektoren pCR II und pCR II-TOPO kloniert werden, da sie die kompatiblen Desoxythymidin-Überhänge am 3'-Ende besitzen.

2.7.6 Transformation von *E.coli* Bakterien

CaCl₂ behandelte Bakterien können durch einen kurzen Hitzeschock mit Plasmid-DNS transformiert werden (Cohen et al., 1972).

Durchführung:

- 100 µl kompetente Bakterien (Lagerung bei -80°C) auf Eis auftauen lassen
- Ligationsansatz, bzw. etwa 100 ng zirkuläre doppelsträngige DNS, dazupipettieren
- Inkubation für 30 min auf Eis
- Hitzeschritt (2 min/42°C)
- Inkubation für 2 min auf Eis
- 1 ml vorgewärmtes LB-Medium zugeben
- Inkubation für 1 h im 37°C Schüttler, um Expression der plasmidkodierten Antibiotikumresistenz zu ermöglichen
- 100 µl und 200 µl ausplattieren und ÜN bei 37°C unter Selektionsdruck wachsen lassen

2.7.7 Southernblot Analyse

Diese Methode kann zum Nachweis bestimmter DNS-Sequenzen in einem DNS-Fragment dienen (Southern, 1975). Durch DNS/DNS Hybridisierung mit einer komplementären Sonde können die gesuchten DNS-Sequenzen markiert und anschliessend detektiert werden.

Alkalischer DNS-Transfer auf Nylonmembranen

Nach dem Restriktionsverdau der DNS mit einem oder mehreren Restriktionsenzymen werden die DNS-Fragmente durch Gelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt. Durch aufeinanderfolgende Säure- und Alkalibehandlung werden die Fragmente in kleinere Stücke zerlegt und denaturiert. Mittels eines Kapillarblots werden sie auf eine Nylonmembran transferiert, so dass ein Replika des Fragmentmusters des Agarosegels auf dem Filter entsteht.

Durchführung:

- Restriktionsverdau von 20 µg chromosomaler DNS
- DNS-Gelelektrophorese in einem 1 % Agarosegel mit 0,2 µg/ml Ethidiumbromid (30V/ÜN)
- Dokumentation mit Längenstandard (z.B. Photographie mit Lineal)
- das Gel zur partiellen Depurinierung etwa 10 min in 0,25 N HCl schwenken
- das Gel zur Denaturierung und Spaltung an den depurinierten Stellen etwa 30 min in 0,4 N NaOH schwenken

- die Nylonmembran auf die gleiche Größe des Gels zurechtschneiden
- Befeuchten der Membran in H₂O_{bidest}
- die Membran in 0,4 N NaOH etwa 15 min äquilibrieren

Aufbau des Kapillarblots:

- Gelträger auf Ränder von zwei mit 0,4 N NaOH Blotlösung gefüllten Wannen stellen
- darauf luftblasenfrei folgende Schichten plazieren
 - ein mit Blotlösung befeuchtetes 3 MM Whatmanpapier, dessen Enden in die Blotlösung eintauchen
 - Gel mit der Oberseite nach unten
 - Nylonmembran
 - 2 Lagen befeuchtetes 3 MM Whatmanpapier
 - 9 Lagen trockenes 3 MM Whatmanpapier
 - ca. 10 cm Zellstoffpapier
 - Glasplatte

Der Kapillarblot wird mit etwa 0,5 kg beschwert und ÜN bei RT inkubiert. Durch die Kapillarkräfte wird die Blotlösung nach oben gesaugt und die DNS-Fragmente werden auf die Nylonmembran transferiert.

- die Membran kurz in 2 x SSC waschen, um Gelreste zu entfernen
- DNS durch UV-Kreuzvernetzung auf der noch feuchten Nylonmembran fixieren

Radioaktive Markierung der Sonde

Zur Herstellung und Markierung der Sonde wird das Klenow-Fragment benutzt, welches an einzelsträngiger DNS den Komplementärstrang synthetisiert. Durch die Zugabe von radioaktiv markierten Nukleotiden zu unmarkierten Nukleotiden, wird die neusynthetisierte DNS radioaktiv (Feinberg and Vogelstein, 1984). Verwendet wurde der "readiprime"-Kit (Amersham) mit dem bis zu 25 ng DNS unter Verwendung von 50 µCi ³²P-dCTP markiert werden können. Nicht eingebaute radioaktive Nukleotide werden mit NucTrap Säulchen (Stratagene) vom Reaktionsansatz abgetrennt.

DNS/DNS Hybridisierung

Die DNS/DNS Hybridisierung zwischen einer markierten, einzelsträngigen Sonde und der dazu komplementären, nachzuweisenden chromosomalen DNS-Sequenz, führt zur Bildung eines stabilen doppelsträngigen DNS/DNS-Hybrids. Die Positionen der markierten Hybridmoleküle können durch anschließende Detektion der Markierung sichtbar gemacht werden. Alle Lösungen sind in Kapitel 2.2.1 aufgeführt.

Durchführung:

- Membran ÜN bei 65°C in 20 ml frischer Hybridisierungslösung prähybridisieren
- markierte, hitzedenaturierte Sonde und 5 mg hitzedenaturierte Lachsspermien-DNS zugeben
- ÜN bei 65°C hybridisieren
- stringentes Waschen mit Lösung I: 2 mal 30 min bei 65°C
- stringentes Waschen mit Lösung II: 1 mal 30 min bei 65°C
- spezifisch gebundene Radioaktivität mit Hilfe eines Phosphoimagers (Molecular Dynamics) oder durch Schwärzung eines Röntgenfilmes detektieren

2.7.8 Amplifikation von DNS-Molekülen durch PCR

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) beruht auf der Eigenschaft von DNS-Polymerasen einzelsträngige DNS als Matrize für die Synthese eines Komplementärstranges zu benutzen, um so extrem viele Kopien einer spezifischen DNS-Sequenz zu produzieren (Mullis and Faloona, 1987). Meist wird als Ausgangsmaterial doppelsträngige DNS benutzt. Nach Hitzedenaturierung hybridisieren spezifische Primer, die jeweils das 5'-Ende und das 3'-Ende der zu amplifizierenden Sequenz flankieren, an die einzelsträngige DNS. Die Primerverlängerung erfolgt durch eine thermostabile DNS-Polymerase. Nach der Synthese des Komplementärstranges führt eine Wiederholung von Hitzedenaturierung, Primerhybridisierung und Primerverlängerung über mehrere Zyklen zur exponentiellen Anreicherung der gewünschten DNS-Sequenz.

Reaktionsansatz:	DNS	ca. 100 ng
	2 oder 3x 1 µl	Primer 1 und 2 (und 3)
	5 µl	10x Puffer (siehe Kapitel 2.2.1)
	10 µl	dNTP (siehe Kapitel 2.2.1)
	1 µl	Taq-Polymerase (5 Einheiten/µl)
	ad 50 µl	H ₂ O _{bidest}

Durchführung:

- Reaktionsansatz auf Eis zusammenpipettieren, kurz vortexen und abzentrifugieren
- vorsichtig mit 50 µl Mineralöl beschichten, um Verdampfen des Ansatzes während der Reaktion zu vermeiden

- Durchführung des Reaktionszyklus unter den in Tabelle 2.17 angegebenen Bedingungen

Tabelle 2.17: Standard PCR-Bedingungen

Funktion	Dauer	Temperatur	
DNS-Denaturierung	5 min	95°C	
DNS-Denaturierung	1 min	95°C	← 30 Zyklen
Primerhybridisierung	30 sec	59-65°C	
Primerverlängerung	1 min 30 sec	72°C	
Lagerung bis zur Weiterverarbeitung	24 h	4°C	

2.7.9 Isolierung gesamtzellulärer RNS aus Gewebe

Das zu untersuchende Gewebe wird unter sterilen Bedingungen aus den Versuchstieren entnommen und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Zur Isolierung der RNS wird eine Methode angewendet, bei der die Zellen durch Homogenisierung und Verwendung von Detergenzien aufgeschlossen werden (Chomczynski and Sacchi, 1987). Detergenzien wie Guanidiniumthiocyanat und Natriumlaurylsarcosin zerstören zelluläre Strukturen und bewirken die Denaturierung von Proteinen. Die durch Zellyse freigesetzten RNasen werden durch Guanidiniumthiocyanat und β -Mercaptoethanol inaktiviert. Die Abtrennung der RNS von anderen Nukleinsäuren erfolgt durch saure Phenolextraktion.

Puffer und Lösungen

Bei der Herstellung folgender Puffer und Lösungen muss darauf geachtet werden, dass jegliche Kontamination mit RNasen vermieden wird. Eine Möglichkeit zur Inaktivierung von RNasen ist die Behandlung von Lösungen mit DEPC, einem RNase Inhibitor. Die anschließende Inaktivierung von DEPC ist unbedingt notwendig, da es sonst durch Carboxymethylierungsreaktionen zur Modifizierung von Purinbasen der RNS kommt.

DEPC-H₂O:

0,1 % DEPC in H₂O_{bidest}

Lösung ÜN rühren

DEPC durch Autoklavieren inaktivieren

35 % Natriumlaurylsarcosin:

Die Lösung wird mit DEPC-H₂O angesetzt

1 M Natriumcitrat, pH = 7,5:

Natriumcitrat in H₂O_{bidest} lösen, pH einstellen
Lösung mit 0,1 % DEPC behandeln
DEPC durch Autoklavieren inaktivieren

Guanidiniumthiocyanat (GSCN):

25 g Guanidinthiocyanat
0,25 g Natriumlaurylsarcosin (0,71 ml einer 35 % Lösung)
0,75 ml 1M Natriumcitrat, pH = 7,5
0,35 ml ME
ad 50 ml DEPC-H₂O

2 M Natriumacetat, pH = 4,0:

Natriumacetat in H₂O_{bidest} lösen
pH mit Eisessig einstellen
Lösung mit 0,1 % DEPC behandeln
Lösung autoklavieren

3 M Natriumacetat, pH = 5,0:

Herstellung s.o.

1 M Tris/HCl, pH = 9,5:

Tris in DEPC-H₂O lösen
pH mit HCl einstellen, dabei den pH nur von entnommenen Aliquots messen
Lösung autoklavieren

Phenol/Chloroform Tris-gesättigt, pH = 9,5:

Phenol und 1 M Tris/HCl, pH = 9,5 1:1 mischen und 30 min rühren
mehrere Stunden stehen lassen bis sich die Phasen getrennt haben
obere wässrige Phase verwerfen
2 x Äquilibrierung wiederholen
1 Volumen Chloroform zugeben
Lagerung im Kühlschrank

Phenol, H₂O gesättigt

Chloroform

RNase freie Pipettenspitzen, Schraubdeckelgefäße, ERG

Durchführung

- Gewebe aus flüssigem Stickstoff entnehmen und in ein 15 ml Schraubdeckelgefäß mit 3 ml kaltem GSCN geben
- Gewebe sofort mittels Ultra-Turrax homogenisieren
- Zentrifugieren (5 min/2000 UpM) um feste Bestandteile abzutrennen
- je 400 µl Überstand in ein ERG geben, 1/10 Volumen 2 M Natriumacetat zugeben und sofort vortexen
- 1 Volumen Phenol (H₂O-gesättigt) zugeben und sofort vortexen
- 1/7 Volumen Chloroform zugeben und kräftig schütteln
- 15 min Inkubation auf Eis
- Zentrifugieren (15 min/13000 UpM/4°C)
- obere wässrige Phase in ein neues ERG überführen und mit 2,5 Volumen EtOH_{abs.} mindestens 1 h bei -20°C fällen
- pelletieren (15min/13000 UpM/4°C)
- 3-5 Pellets in 400 µl GSCN lösen und wiederum mit 2,5 Volumen EtOH_{abs.} mindestens 1 h bei -20°C fällen
- pelletieren (15 min/13000 UpM/ 4°C)
- Phenol/Chloroform-Extraktion:
 - Pellet in 400 µl DEPC-H₂O aufnehmen und lösen
 - 1 Volumen Phenol/Chloroform (Tris gesättigt, pH = 9,5) zugeben und 30 sec. vortexen
 - zentrifugieren (1 min/13000 UpM/4°C)
- Überstand mit 0,3 M Natriumacetat und 2,5 Volumen EtOH_{abs.} mindestens 1 h bei -20°C fällen
- pelletieren (15 min/13000 UpM/4°C)
- Pellet mit 70 % Ethanol waschen und Ethanol quantitativ abnehmen
- Pellet in 100-200 µl DEPC-H₂O aufnehmen und 5 min bei 65°C lösen
- Bestimmung der RNS-Konzentration bei 260 nm im Photometer

2.7.10 Isolierung gesamtzellulärer RNS aus Zellen

Zur Isolierung von RNS aus Zellen, wurden diese zunächst mit PBS gewaschen und dann direkt in kaltem GSCN lysiert. Die weitere RNS Isolierung erfolgte analog zu 2.7.9.

2.7.11 cDNS Synthese

Bei der cDNS oder der komplementären DNS handelt es sich um eine Kopie der mRNA, die mit Hilfe eines retroviralen Enzyms, der reversen Transkriptase, in DNS umgeschrieben wird. Die Verwendung von Oligo(dT)₁₂₋₁₈ Primern erlaubt spezifisch die reverse Transkription von mRNA, da diese Oligonukleotide an das Poly-A Ende der mRNA binden. Zusätzlich wird ein Hexamer Oligonukleotidgemisch als Primer eingesetzt. Im Reaktionsansatz befinden sich neben den Primern und dNTPs auch RNasin, ein RNase-Inhibitor, und DTT, ein Reduktionsmittel, das die reverse Transkriptase stabil hält. Für die cDNS-Synthese wurde der "First Strand cDNS Synthesis Kit" der Firma GibcoBRL verwendet.

Reaktionsansatz:	8 µl	2 µg gesamtzelluläre RNS
	1 µl	Oligo(dT) ₁₂₋₁₈ Primer
	1 µl	Hexamer Primer
	4 µl	Transkriptionspuffer
	2 µl	DTT (0,1 M)
	2 µl	dNTP (200 µM)
	0,5 µl	RNasin (40 U/µl)
	1 µl	reverse Transkriptase

Durchführung:

- 2 µg RNS mit DEPC-H₂O ad 8 µl auffüllen
- Primer zugeben und vortexen
- 10 min 70°C, anschliessend rasches Abkühlen auf Eis
- Puffer, DTT, dNTPs, RNasin und reverse Transkriptase zugeben
- 1 h 37°C
- Inaktivierung des Enzyms 5 min bei 95°C
- Lagerung der cDNS bei -20°C

2.7.12 Elektrophoretische Auftrennung von RNS

Die Elektrophorese von RNS erfolgte in einem denaturierendem Agarosegel, um die Hybridisierung von RNS-Molekülen und die Ausbildung von Sekundärstrukturen zu verhindern. Bei der gebräuchlichsten Methode die RNS einzelsträngig zu halten, läßt man die freien Amine der Purin- bzw. Pyrimidinbasen mit Formaldehyd reagieren. Die resultierende Schiff'sche Base kann keine Wasserstoffbrückenbindungen zwischen komplementären Basen ausbilden (Lehrach et al., 1977).

Durchführung:

- in einer gebackenen 500 ml Schraubdeckelflasche 2,5 g Agarose und 180 ml DEPC-H₂O aufkochen, bis eine klare Lösung entsteht
- auf ca. 50°C abkühlen lassen
- unter Schwenken 45 ml Formaldehyd (37 %) und 25 ml 10 x MOPS zugeben
- Gel gießen und auspolymerisieren lassen
- erstarrtes Gel in Elektrophorese Apparatur einsetzen und mit Laufpuffer überschichten
- pro Spur 20 µg RNS in 10 µl DEPC-H₂O 1:1 mit RNS-Auftragspuffer versetzen
- 10 min bei 70°C denaturieren und auf das Gel auftragen
- Auftrennung bei konstanten 20 V ÜN

2.7.13 Northernblot Analyse

Transfer von RNS auf Nylonmembranen

Der Transfer vom Agarosegel auf eine Nylonmembran erfolgte durch Kapillarkräfte, die durch den aufsteigenden Puffer hervorgerufen wurden. Durch Methylenblaufärbung der Membran kann die RNS sichtbar gemacht werden (Wilkinson et al., 1991).

Durchführung.

- Agarosegel zweimal 5 min in H₂O_{bidest} schwenken, um Formaldehyd zu entfernen
- Nylonmembran auf die gleiche Größe des Gels zurechtschneiden
- die Membran ca. 5 min mit 10 x SSC äquilibrieren
- Kapillarblot mit 10 x SSC Puffer aufbauen
- Blot mit ca. 0,5 kg beschweren und ÜN inkubieren
- die Membran mit der gebundenen RNS kurz in 2 x SSC waschen
- die RNS auf der noch feuchten Membran durch UV Kreuzvernetzung fixieren
- Membran in Methylenblau-Färbelösung leicht schwenken, bis RNS sichtbar wird
- Hintergrundfärbung durch Schwenken in H₂O_{bidest} entfernen

Radioaktive RNS/DNS Hybridisierung

Die DNS/RNS Hybridisierung zwischen einer markierten, einzelsträngigen DNS-Sonde und der dazu komplementären, nachzuweisenden RNS-Sequenz, führt zur Bildung eines stabilen doppelsträngigen DNS/RNS-Hybrids. Die Positionen der markierten Hybridmoleküle können durch Schwärzung eines Röntgenfilmes sichtbar gemacht werden. Alle Lösungen sind in Kapitel 2.2.1 aufgeführt.

Durchführung:

- Membran mehrere Stunden bei 42°C in 20 ml Prähybridisierungslösung unter Zugabe von 100 µg/ml denaturierter Lachssperma DNS inkubieren
- Hybridisierungslösung erneuern, diesmal ohne Lachssperma DNS
- markierte, hitzedenaturierte Sonde zugeben (Markierung wie in Kapitel 2.7.7) und ÜN bei 42°C hybridisieren
- stringentes Waschen mit Waschlösung I (Northern): 3 mal 15 min bei RT
- stringentes Waschen mit Waschlösung II (Northern): 3 mal 30 min bei 65°C
- stringentes Waschen mit Waschlösung III (Northern): 2 mal 15 min bei RT
- spezifisch gebundene Radioaktivität mit Hilfe eines Phosphoimagers (Molecular Dynamics) oder durch Schwärzung eines Röntgenfilmes detektieren

2.8 Zellkultur

2.8.1 Kultivierung von CHO Zellen

Zellkultur von CHO Zellen

Alle Zellkulturarbeiten wurden in Sterilbänken durchgeführt. Dabei wurde grundsätzlich mit Laborhandschuhen gearbeitet. Die Inkubation der Zellen erfolgte in Brutschränken bei 37°C, 7 % CO₂ und wasserdampfgesättigter Atmosphäre. Die Zellen wurden regelmäßig mit frischem Medium versorgt und spätestens bei Erreichen der Konfluenz passagiert. Die Zellablösung dieser adherent wachsenden Zellen erfolgte durch Inkubation der mit PBS gewaschenen Zellen mit einer Trypsin/EDTA-Lösung. Nach 10 min wurde die Reaktion durch Zugabe von Zellkulturmedium gestoppt, und die Zellen neu ausgesät.

Elektroporation von CHO Zellen

CHO Zellen wurden durch Elektroporation mit Expressionsvektoren für mLIGHT und mTNF transfiziert.

Durchführung:

- Zellen einen Tag vor der Elektroporation passagieren
- pro Elektroporation 1 x 10⁶ Zellen in 800 µl CHO aufnehmen
- 10 µg Plasmid-DNS zur Zellsuspension dazupipettieren
- Ansatz in eine Elektroporationsküvette überführen
Elektroporation mit 240 V und 960 µF
- nach der Elektroporation die Zellen 5 min auf Eis stehen lassen
- Zellen in 10 ml Medium aufnehmen
- Zentrifugation bei 1200 UpM, 5 min um tote Zellen abzutrennen
- Zellpellet in frischem Medium aufnehmen und ÜN im Brutschrank inkubieren

Selektion stabiler CHO-Zellklone

Nach der Transfektion wurden die CHO Zellen einem Selektionsdruck durch G418 unterworfen, um stabil exprimierende CHO-Zell Klone anzureichern.

Durchführung:

- nach der Transfektion werden die Zellen zwei Tage ohne Selektionsdruck kultiviert
- am Tag 2 erfolgt Selektion durch Zugabe von Geneticin (G418, 1mg/ml) im Medium (200 µg/ml)
- Mediumwechsel alle zwei Tage
- wenn sich überlebende CHO-Zell Klone etabliert haben (Tag 10-12), werden die Kolonien mit PBS gewaschen
- CHO-Zell Kolonien mit 10 ml PBS überschichten
- die Einzelkolonien mit einer sterilen Pipette in 20 µl PBS aufnehmen und in eine Vertiefung einer 96-well Platte überführen
- die Kolonien durch Trypsin/EDTA Behandlung vereinzeln
- nach 2 Tagen die Zellen auf 48-well Platten verteilen
- bei vollem Bewuchs der Platten Zellen sukzessive auf 24-, 6-well und 5 cm Platten passagieren
- Überprüfung der einzelnen Klone auf Expression mittels ELISA (siehe 2.10.6) oder FACS-Färbung (siehe 2.10.5)

2.8.2 Kultivierung embryonaler Stammzellen und embryonaler Fibroblasten

Zellkultur von ES/EF Zellen

Embryonale Stammzellen wurden grundsätzlich auf mit Mitomycin C vorbehandelten EF Zellen (2 h, 37°C) kokultiviert, um die notwendigen Wachstumsfaktoren zur Verfügung zu stellen. Zusätzlich wurde den ES-Zell Kulturen LIF-Überstand (1000 U/ml Endkonzentration) zugegeben, um das Ausdifferenzieren zu verhindern. Undifferenzierte ES Zellen erscheinen im Lichtmikroskop als spindelförmige Kolonien mit einem glatten, hellscheinenden Rand. Die ausdifferenzierten Kolonien dagegen erscheinen grau-granuliert, werden matt und bilden Pseudopodien aus.

Elektroporation von ES Zellen

Die embryonalen Stammzellen wurden durch Elektroporation mit dem LIGHT-Rekombinationsvektor transfiziert.

Durchführung:

- die ES Zellen auf drei 15 cm-Zellkulturplatten expandieren (ca. 5×10^7 Zellen)
- für die Elektroporation in 7 ml ES-Medium aufnehmen und mit 200 µg linearisiertem Rekombinationsvektor in 1 ml PBS mischen
- je 800 µl in Elektroporationsküvetten überführen
- Elektroporation: 340 V/250 µF
- Elektroporierte Zellen 10-15 min auf Eis abkühlen lassen
- jeden Elektroporationsansatz auf zwei vorbereitete 10 cm EF-Kulturschalen verteilen

Selektion rekombinanter ES-Zellklone

Nach der Transfektion wurden die ES Zellen einem zweifachen Selektionsdruck mit G418 und Gancyclovir unterworfen, um richtig rekombinierte ES-Zell Klone anzureichern.

Durchführung:

- nach der Transfektion werden die Zellen zwei Tage ohne Selektionsdruck kultiviert
- am Tag 2 erfolgt Selektion durch Zugabe von Geneticin (G418) im Medium (200 µg/ml)
- am Tag 4 erfolgt zusätzliche Selektion mit 2 mg/ml Gancyclovir im Medium
- Mediumwechsel alle zwei Tage
- wenn sich überlebende ES-Zell Klone etabliert haben (Tag 14-16), werden die Kolonien mit PBS gewaschen
- ES-Zell Kolonien mit 10 ml PBS überschichten

- die Einzelkolonien mit einer sterilen Pipette in 20 µl PBS aufnehmen und in eine Vertiefung einer 96-well Platte überführen
- die Kolonien durch Trypsin/EDTA Behandlung vereinzeln
- Kultivierung mit EF Zellen
- nach 2 Tagen die Zellen auf drei 96-well Platten verteilen
- zwei der drei 96-well Platten sehr dicht bewachsen lassen, dann das mit PBS gewaschene Zellpellet bei -20°C wegfrieren
- die Zellen in der dritten 96-well Platte auf 48-well Platten verteilen und in Einfriermedium in flüssigem Stickstoff einfrieren, wenn diese gut bewachsen sind

Einfrieren von ES Zellen

Durchführung:

- Die Zellen vor dem Einfrieren mit Trypsin/EDTA vereinzeln und die Reaktion mit Medium abstoppen
- Zellen aufnehmen in Einfriermedium:
 - 48-well Platte: die Zellsuspension 1:1 mit dem Einfriermedium (80 % FKS, 20 % DMSO) vermischen
 - Klone auf 5 oder 10 cm Kulturschalen: Zellsuspension abzentrifugieren (5 min, 1200 UpM), aufnehmen in Einfriermedium (50 % Medium, 40 % FKS, 10% DMSO)
- Zellen 30 min bei -20°C inkubieren, dann ÜN bei -80°C lagern und anschliessend in flüssigem Stickstoff einfrieren

2.8.3 Kultivierung von Splenozyten

Nach Entnahme (siehe 2.9.4) wurde die Milz in Medium über ein 70 µm Zellsieb homogenisiert. Um die Zellsuspension von Erythrozyten zu befreien, wurde nach Zentrifugation (1400 UpM für 5 min) das Zellpellet in 3 ml Erythrozyten-Lysepuffer (siehe 2.2.1) aufgenommen und 3 min bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 7 ml Medium gestoppt und die verbleibenden Leukozyten durch Zentrifugation und nochmaliges Sieben von Zellresten abgetrennt. Ein Aliquot der Zellsuspension wurde im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau gemischt und in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Tote Zellen sind anhand ihrer Blaufärbung von vitalen Zellen zu unterscheiden und werden nicht mitgezählt.

2.8.4 Kultivierung von Dendritischen Zellen aus Knochenmark

Femur und Tibia wurden aus Spendermäusen entnommen (siehe 2.9.4) und von umgebenden Geweberesten freipräpariert. Nachdem das Knochenmark mit Hilfe einer Kanüle ausgespült worden war, wurden die Knochenmarkszellen durch mehrmaliges Aufziehen in einer Pipette homogenisiert und in DC-Medium (siehe Tabelle 2.1) in Kultur genommen. Nach 3 Tagen in Kultur erfolgt ein Mediumwechsel. Die auf diese Weise herangereiften Dendritischen Zellen wurden an Tag 6 für Stimulationsexperimente verwendet und durch Abspülen von an die Plastikmatrix festadhärierten Makrophagen abgetrennt.

2.9 Tierversuche

2.9.1 Superovulation

Um Embryonen im Blastozystenstadium entnehmen zu können und um die Anzahl der gebildeten Embryonen zu erhöhen, wurden weibliche Mäuse superovuliert. Dazu wurden den Mäusen zwischen 14-17 Uhr 10 U PMSG und 44-48 h später 10 U hCG intraperitoneal injiziert. Danach wurden die Mäuse mit männlichen Mäusen verpaart. Der Zeitplan war so organisiert, dass die Ovulation, die etwa 12 h nach hCG Gabe erfolgte, auf die Mitte der Dunkelphase fiel. Innerhalb von weiteren 12 h erfolgte die Untersuchung auf einen Vaginalpfropf (plug), der auf eine Begattung hinweist. Der Tag, an dem ein Vaginalpfropf entdeckt wird, gilt gemäß der üblichen Konventionen als Tag 0,5 der Embryonalentwicklung. Für die Blastozysteninjektion wurden die Embryonen am Tag 3,5 entnommen.

2.9.2 Gewinnung embryonaler Fibroblasten

Die embryonalen Fibroblasten für die Kokultivierung von ES Zellen wurden aus superovulierten CD1 Mäusen (siehe 2.9.1) am Tag 14 *post coitum* gewonnen. Den Spendertieren wurde der Uterus steril entnommen und in einer Petrischale mit PBS gewaschen. Anschliessend wurden die Embryonen aus dem Uterus präpariert, in PBS gewaschen und der Kopf und die fötale Leber abgetrennt, um einen Großteil der nicht fibroblastischen Zellen zu entfernen. Das restliche embryonale Gewebe wurde mit einem Skalpell so fein wie möglich zerteilt, dann durch ein Sieb gedrückt und in EF Medium kultiviert. Pro 10 cm Kulturschale wurden etwa 5×10^6 Zellen ausgesät. Die Zellen wurden alle zwei Tage mit Medium versorgt, expandiert und als Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.9.3 Generierung chimärer Mäuse

Für die Generierung chimärer Mäuse aus homolog rekombinierten ES Zellen kam die Blastozysteninjektion zur Anwendung. Die Embryonen wurden dazu im Blastozystenstadium am Tag 3,5 der Embryonalentwicklung aus dem Uterus superovulierter C57BL/6 Weibchen retrograd ausgespült und in M2 Medium aufgenommen. Etwa 15-20 der homolog rekombinierten ES Zellen wurden unter einem Licht-

mikroskop mit Hilfe von Mikromanipulatoren in das Blastocoel injiziert. Anschliessend erfolgte der Uterustransfer der manipulierten Blastozysten in pseudoschwangere Ammenmütter. Bis zu 15 Blastozysten wurden pro Uterushorn transferiert.

2.9.4 Organentnahme

Zur Entnahme von Organen oder Zellen aus Mäusen, wurden diese durch Genickbruch schmerzfrei getötet und die jeweiligen Organe nach Desinfektion des Operationsgebietes mit 70 % EtOH steril entnommen.

2.9.5 Immunisierung von Mäusen

Haptenisiertes Hühner γ Globulin ((4-Hydroxy-3-nitrophenyl-acetyl)-chicken γ globulin im molaren Verhältnis 19:1; NP₁₉-CG) wurde mit Alum (KAl(SO₄)₂) präzipitiert und zur Immunisierung von Mäusen verwendet. Die Immunisierung erfolgte durch intraperitoneale Injektion von 5 μ g/Maus NP₁₉-CG in 0,2 ml sterilem PBS.

2.9.6 Infektion mit Vesikulärem Stomatitis Virus (VSV)

VSV (Vesicular Stomatitis Virus Indiana Serotyp; Mudd-Summers Isolat) wurde auf BHK Zellen zu einer Virus Stammsuspension der Dichte 10⁹ PFU/ml angezüchtet. Die Experimentaltiere wurden i.v. an Tag 0 mit 2 x 10⁶ PFU VSV infiziert.

Zur Bestimmung der neutralisierenden Antikörper Titer wurden serielle 2-fach Verdünnungen (1:40 vorverdünnt) im Verhältnis 1:1 mit einer VSV-Suspension der Dichte 500 PFU/ml gemischt und 90 min bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. 100 μ l des Gemischs wurden auf eine Vero-Zellschicht in 96-well Platten aufgebracht und für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Vero-Zellschicht wurde mit 100 μ l DMEM-Medium mit 1% Methylzellulose überschichtet und für 24 h bei 37°C inkubiert. Dann wurde die Überschichtung entfernt, die Vero-Zellschicht fixiert und mit Kristallviolett-Lösung (siehe 2.2.1) gefärbt. Die Verdünnungsstufe, die die Plaquezahl um 50 % reduziert, wurde als Titer gemessen. Um IgG Titer zu bestimmen, wurde unverdünntes Serum im Verhältnis 1:1 mit 0,1 M β -ME in DMEM Medium für 1 h bei RT behandelt (Lopez-Macias et al., 1999).

Die *ex vivo* CTL Aktivität von Splenozyten aus Experimentaltieren wurde an Tag 6 nach Infektion mittels Chrom-Assay (siehe 2.10.4) gegen VSV-infizierte syngene MC57G-Zielzellen bestimmt.

2.9.7 Infektion mit Listerien

Die Anzucht von *L. monocytogenes* (ATCC strain 43251) erfolgte in 5 ml brain-heart infusion Medium durch aerobe Inkubation bei 37°C. Die ÜN Kulturen wurden bei Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,7 in Me-

dium seriell 10-fach verdünnt. Den Experimentaltieren wurden 350 µl der zweiten, dritten oder vierten Verdünnungsstufe i.p injiziert, was einer Bakterienmenge von etwa 3 500 000, 350 000 bzw. 35 000 entspricht. Die tatsächlich verabreichte Dosis an Listerien wurde durch Auszählen der Kolonien einer ÜN Kultur von 10 µl Aliquots der einzelnen Verdünnungen auf Columbia Red Blutagar Platten ermittelt. Die für dieses Infektionsmodell empirisch ermittelte LD₅₀ liegt bei 350 000 Listerien/Maus.

Das Überleben der Mäuse wurde über einen Zeitraum von 12 Tagen täglich 2 mal kontrolliert.

Zur Bestimmung der Bakterienlast in Leber und Milz wurden Organe explantiert und in PBS mittels Ultra-Turrax homogenisiert. 10µl Aliquots aus den 10-fach Verdünnungsstufen 1 bis 8 in PBS wurden auf Columbia Red Blutagar Platten aufgebracht und die Koloniezahl nach 48 h Bebrütung bei 37°C bestimmt.

2.9.8 Hauttransplantation

Hauttransplantationen wurde an narkotisierten Empfängern analog der Technik von Davis et al. (Davies et al., 1996) durchgeführt. In Kürze: Es wurde ein 0,5 cm² großes Stück Schwanzhaut (Epidermis, Corium, Subcutis) auf die laterale Flanke der Empfängermaus transplantiert. Die Transplantate wurden täglich nach Entfernung des Verbandes (Tag 8) kontrolliert und als abgestossen gewertet, wenn kein lebensfähiger Donor-Hautbereich mehr vorhanden war. Die Empfängertiere waren mindestens 4-mal in den C57BL/6 genetischen Hintergrund rückgekreuzt.

2.10 Immunologische und zellbiologische Methoden

2.10.1 Immunhistochemie

Nach Entnahme wurden die Organe in Einbettmedium eingegossen, in N₂-gekühltem 2-Methylbutan schockgefroren und bei -80°C bis zur Verwendung gelagert. Gefrierschnitte wurden in einer Dicke von 8 µm angefertigt, auf Objektträger aufgebracht und 15 min bei RT luftgetrocknet, bevor sie in eisgekühltem Aceton 8 min fixiert und bei -80°C aufbewahrt wurden. Unmittelbar vor der Färbeprozedur wurden die aufgetauten Schnitte in PBS für 5 min bei RT rehydriert. Alle nachfolgenden Schritte wurden in einer feuchten Kammer bei RT durchgeführt und sind durch jeweils 3 Waschschrte in PBS unterbrochen.

Immunhistochemie zur Analyse am Hellfeld-Mikroskop

Zur Markierung spezifischer Zell-Antigene wurden die Gewebeschnitte 20 min in PBS mit 1 % BSA, 5 % Ziege-Normal Serum (zur Blockierung unspezifischer AK-Bindungen) und 0,5 % H₂O₂ (zur Eliminierung endogener Peroxidase-Aktivität) inkubiert. Bei Verwendung biotinylierter AKs wurde zusätzlich Avidin beigefügt, um endogenes Biotin abzubinden, wonach die freien Bindungsstellen des Avidin wiederum mit Biotin für 20 min abgesättigt wurden. Spezifische Primär- und Sekundär-AKs wurden in vorher titrier-

ten Konzentrationen in PBS mit 1 % BSA für 45-60 min, Biotin-Bindungs Reagenzien für 20-30 min angewendet. Einfach-Färbungen wurden mit POX-konjugierten Sekundär-AKs durchgeführt, die das Substrat AEC innerhalb von ca. 10 min zu einem roten Farbniederschlag umsetzen. Die Gewebeschnitte wurden daraufhin mit Haematoxilin gegengefärbt (1 min Färbung, 1 min Bläuen mit H₂O). Für die 2-Farben-Immunhistochemie wurde der POX-konjugierte AK wie oben beschrieben in rot detektiert, wonach die AP-Reaktion unter Verwendung des AP Substrat-Kit III nach 5-15 min zu einer Blaufärbung an der Stelle des zweiten Zellmarkers führt. Die Gewebeschnitte wurden nun 30 min luftgetrocknet, mit Glycerolgelatine eingedeckelt und an einem Hellfeld-Mikroskop analysiert.

Immunhistochemie zur Analyse am konfokalen Laser-Mikroskop

Für die Analyse am konfokalen Laser-Mikroskop wurden gefrorene Gewebeschnitte aufgetaut, rehydriert und geblockt wie oben beschrieben. Primär-AKs wurden hier biotinyliert oder direkt FITC-markiert, Streptavidin PE-konjugiert für 1 h im Dunkeln eingesetzt. Die Schnitte wurden mit Fluoromount-G eingedeckelt, 2-24 h im Dunkeln bei 4°C zur Verfestigung des Eindeckelmediums inkubiert und am Laser-Mikroskop analysiert.

2.10.2 Proliferationsassays

Ruhende Zellen können durch eine Reihe von polyklonalen Aktivatoren zur Proliferation angeregt werden, die viele oder alle TZR-Komplexe antigenunspezifisch binden, indem sie die Antigen:MHC-induzierten Veränderungen am TZR-Komplex nachahmen. Lektine (pflanzliche Polymer-Proteine, wie z.B. ConA) binden spezifisch bestimmte Zuckerreste von Zelloberflächen-Glykoproteinen wie die der TZR oder anderer kostimulatorischer Moleküle und stimulieren so die T Zelle. Auch AKs spezifisch für invariante Rahmen-Epitope des TZR oder des CD3-Korezeptors agieren als polyklonale T Zell Aktivatoren. Diese AKs müssen allerdings mittels Sekundär-AKs oder, wie in diesem Fall, über Fc-Rezeptoren der APCs kreuzvernetzt werden, um optimale Aktivierungen zu induzieren. Die proliferative Antwort ist messbar anhand des [³H]-Thymidineinbaus oder in eines CFSE-Assays.

[³H]-Thymidineinbau

Durch die Zugabe von [³H]-Thymidin zum Kulturmedium wird die Aufnahme der Markierung in die DNA im Verlauf wiederholter Zellteilungen detektiert wird. Zur Untersuchung der TZR-vermittelten Zell Aktivierung wurden Splenozyten in der Konzentration 10⁵ Zellen pro Vertiefung mit seriell verdünnten Konzentrationen an löslichem anti-CD3 AK in 96-well Rundboden-Platten für 72 h stimuliert. Die Lektin-induzierte T Zell Proliferation wurde mit 2,5 x 10⁴ Splenozyten pro Vertiefung mit seriell verdünnten Konzentrationen an ConA für 32 h durchgeführt. Die Proliferation der T Zellen wurde durch Zugabe von 1 µCi [³H]-Thymidin pro Vertiefung für die letzten 6 bis 9 h der Kultur bestimmt und mittels eines β-Counters direkt vermessen.

CFSE-Assay

Der Fluoreszenzfarbstoff 5(6)-Carboxyfluoresceindiacetat Succinimidylester (CFSE) diffundiert passiv in die Zelle und bleibt farblos und nicht-fluoreszierend, bis die Acetatgruppen durch intrazelluläre Esterasen abgespalten werden, wodurch ein stark leuchtendes und aminreaktives Fluorophor entsteht. Durch Reaktion mit Lysin-Seitengruppen oder anderen Aminresten von intrazellulären aber auch Zelloberflächen-Proteinen bildet diese Markierung irreversible Protein-Addukte. Teilen sich die Zellen, wird die CFSE-Markierung gleichmässig auf die Tochterzellen verteilt, die somit nur noch mit halber Fluoreszenzintensität im Vergleich zu den Parentalzellen markiert sind. Der CFSE Fluoreszenzfarbstoff besitzt Exzitations/Emissionsmaxima von ~495/525 nm und kann damit mittels Durchflußzytometrie (2.10.5) bei einer Exzitationswellenlänge von 488 nm vermessen werden. Für die Analyse der Zellteilungsaktivität wurden Splenozyten mit 5µM CFSE in serumfreiem RPMI-Medium 10 min bei 37°C markiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe eines identischen Volumens an FKS gestoppt und überschüssiges, an FKS-Proteine gekoppeltes CFSE durch 2-maliges Waschen entfernt. Die Stimulation erfolgte durch Inkubation mit 2 µg/ml löslichem anti-CD3 mAK bei einer Zellkonzentration von 10⁶ Splenozyten/ml in 24-well Zellkulturplatten. Die Zellteilung wurde nach 0 bis 4 Tagen mittels FACS-Analyse gemessen. Dabei wurden identische Zahlen an lebenden bzw. lebenden CD4⁺ oder CD8⁺ Zellen in die Analyse mit einbezogen.

2.10.3 Allogene "Mixed Lymphocyte Reaction" (MLR)

Als "Mixed Lymphocyte Reaction" (MLR) wird die Proliferation von T Lymphozyten in Kultur als Antwort auf Zellen bezeichnet, die allogene MHC Moleküle exprimieren. Die Splenozyten eines Donors, unter denen sich auch APCs befinden, wurden radioaktiv bestrahlt (30 Gy) und dienten als Stimulator Zellen, die nicht mehr über DNA Synthese oder Zellteilung auf die Stimulation durch die zweite Population antworten können. Die nicht-bestrahlte Zellpopulation proliferiert und differenziert zu Effektorzellen aus. Nach 5 Tagen Inkubation wurden die Kulturen auf Zytokinproduktion (2.10.6), Aktivierungsstadium (2.10.5) und CTL Aktivität (2.10.4) untersucht. Im vorliegenden Fall wurden Splenozyten des Haplotyps H-2^d als Stimulatorzellen und Splenozyten des allogenen Haplotyps H-2^b als Effektorzellen verwendet. Beide Populationen wurden im Verhältnis 1:1 in 12-well Platten in einer Zellkonzentration von 2 x 10⁶ Zellen/ml kokultiviert.

2.10.4 CTL Chrom-Assay

Die CD8 T Zell-Funktion kann in einem CTL Chrom-Assay analysiert werden, indem die spezifische Lyse einer Zielzelle durch eine aktivierte zytotoxische T Zelle gemessen wird. Lebende Zellen nehmen radioaktiv markiertes Natrium-Chromat (Na₂⁵¹CrO₄) auf, geben es aber spontan nicht wieder ab. Wenn diese markierten Ziellzellen abgetötet werden, wird das radioaktive Chromat freigesetzt und kann im Überstand von Kulturgemischen aus Zielzellen und zytotoxischen Effektor T Zellen gemessen werden.

Durchführung:

- Zielzellen einen Tag vor Durchführung des Assays umsetzen
- 1×10^6 Zielzellen mit $75 \mu\text{Ci Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ für 1 h bei 37°C zur Markierung inkubieren
- 2 x Waschen mit 10 ml Medium und Zentrifugieren (5 min 1500 UpM)
- $100 \mu\text{l}$ (10^3 Zielzellen) im Verhältnis 1:1 zu seriell verdünnten Effektor-Zellen in 96-well Spitzboden Platten zugeben
- Inkubation für 4 h bei 37°C , 5 % CO_2
- $100 \mu\text{l}$ Überstand aus jeder Vertiefung entnehmen und Radioaktivität in γ -Counter vermessen
- Für die Messung der Spontanlyse wird der Überstand aus Vertiefungen verwendet, in denen sich nur Zielzellen befanden (8-fach Bestimmung)
- Für die Messung der Maximallyse werden die Zielzellen in der Vertiefung resuspendiert und hieraus $100 \mu\text{l}$ vermessen (4-fach Bestimmung)
- Die Spezifische Lyse berechnet sich nach der Formel:

$$\% \text{ spezifische Lyse} = [\text{cpm (Probe)} - \text{cpm (Spontanlyse)}] / [\text{cpm (Maximallyse)} - \text{cpm (Spontanlyse)}] \times 100$$

Die Spontanlyse lag in den hier durchgeführten Assays in einem Bereich von 4 % bis 10 %.

2.10.5 Durchflußzytometrie (FACS-Analyse)

Ein Durchflußzytometer ist ein sehr effizientes Instrument zur qualitativen und quantitativen Untersuchung unterschiedlichster Zellpopulationen. Da es in den meisten Fällen mit einem zusätzlichen Zellseparator ausgestattet ist, wird das Durchflußzytometer im allgemeinen Sprachgebrauch auch kurz FACS (Fluorescence-activated cell sorter) genannt. Zellen, die zuvor mit einem Fluoreszenz-konjugierten AK oder sonstigem spezifischen Reagenz markiert wurden, werden hierbei in einem Überschuß an Salzlösung durch eine Düse gepreßt, die einen feinen Flüssigkeitsstrahl generiert, in dem die Zellen einzeln und durch Intervalle getrennt vorliegen. Die Zellen passieren einen Laserstrahl und streuen hierbei das Laserlicht. Dabei werden die an die Zelle gebundenen Fluoreszenzfarbstoffe angeregt und emittieren wiederum Licht einer bestimmten Wellenlänge. Sensible sogenannte Photomultiplier detektieren sowohl die Lichtstreuung, die Aufschluß über Größe und Granularität der Zelle gibt, als auch die Fluoreszenz-Emissionen, die auf an die Zelle gebundene AKs und damit auf Expression entsprechender Oberflächenmarker hinweisen. Permeabilisiert man die Zellemembran mit Hilfe von Detergenzien, ist auch die intrazelluläre Färbung z.B. von Zytokinen möglich. Die Kombination von geeigneten Antikörpern und Fluoreszenzfarbstoffen ermöglicht die gleichzeitige Analyse mehrerer Antigene auf der Oberfläche einer Zelle. Voraussetzung sind Farbstoffe, die sich in ihren Emissionsspektren unterscheiden und deshalb getrennt voneinander gemessen werden können. Als Fluoreszenzfarbstoffe wurden FITC (Emissionsmaximum 530 nm), PE (585 nm), PerCP (682 nm) und Cy5 (674 nm) verwendet. Je nach untersuchten Antigenen wurden meistens FITC-, PE- und Cy5- direktmarkierte Antikörper eingesetzt. Bei einem vierten AK handelt es sich in der Regel um einen biotinylierten Antikörper mit Streptavidin-

PerCP als Zweitreagenz. Die Analysen der Immunfluoreszenz erfolgte am FACScalibur Durchflußzytometer mit CellQuest-Software.

FACS-Analyse von Oberflächenantigenen

Zum Nachweis der Expression von Zelloberflächenantigenen wurden die zu testenden Zellen in FACS Färbepuffer aufgenommen. Anschliessend wurden sie nach 5 min Vorinkubation mit 10 µl Fc-Block 20 min mit 30 µl Primär-AK bei 4°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen erfolgte gegebenenfalls die Inkubation mit einem Sekundärreagenz für 20 min bei 4°C. Nach wiederum zweimaligem Waschen wurden die Zellen in 200 µl FACS Färbepuffer resuspendiert.

Intrazelluläre Zytokinfärbung

Für die Fluoreszenzmarkierung intrazellulärer Zytokine wurden die Zellen nach der Oberflächenfärbung mit 4% Formaldehyd in PBS fixiert (20 min, RT) und mit 0,5 % Saponin (in FACS Färbepuffer, 25 min, RT) permeabilisiert. Anschliessend wurden die Zellen mit PE-markierten anti-Zytokin AKs für 25 min bei RT inkubiert, zweimal gewaschen und in 200 µl FACS-Färbepuffer resuspendiert.

2.10.6 ELISA

Das grundlegende Prinzip eines ELISAs (Enzyme linked immuno-sorbent assay) ist die Verwendung eines Enzyms zur Detektion einer Antigen-AK Bindung. Das Enzym setzt ein farbloses Substrat (Chromogen) in ein farbiges Produkt um, was auf eine vorhandene Antigen-Ak Bindung hinweist. Je nach Aufbau können entweder AKs oder Antigene, wie z.B. Zytokine, mittels ELISA detektiert werden.

Detektion von Hapten-spezifischen Immunglobulin Subklassen im Serum

10 Tage nach der Immunisierung mit NP-haptenisierem CG wurde den Experimentalmäusen Blut aus der Schwanzvene entnommen und das Serum zur weiteren Verarbeitung bei -20°C aufbewahrt. Für die Bestimmung von niedrigaffinem IgM bzw. hochaffinen IgG Subklassen im Serum wurden ELISAs für dicht haptenisieretes (NP₁₂-BSA) bzw. spärlich haptenisieretes (NP₅-BSA) BSA durchgeführt. Alle verwendeten Reagenzien sind in 2.2.1 und Tabelle 2.14 aufgeführt. 96-well Platten wurden ÜN mit entsprechendem NP-BSA vorkonjugiert und für 1 h bei RT geblockt. Standards und Proben wurden in 2- bzw. 3-fach Bestimmung in die Vertiefungen pipettiert 1 h bei RT inkubiert, gefolgt von Waschschritten und der Zugabe von AP-gekoppeltem Sekundärantikörper. Die Detektion erfolgte über Umsetzung von farblosem p-Nitrophenylphosphat zu gelblichem p-Nitrophenyl.

Detektion von Zytokinen in Zellkulturüberständen

Zur Bestimmung von Zytokinkonzentrationen in Kulturüberständen wurden ELISA-Kits der Firma R&D verwendet. Diese arbeiten nach dem Prinzip des Sandwich-ELISAs. Ein affinitätsgereinigter AK spezi-

fisch für ein bestimmtes Zytokin wurde auf eine 96-well Platte vorfixiert. Vorhandenes Zytokin in Standards, Kontrollen und Proben wird von den AKs gebunden, ungebundene Substanzen werden durch Waschen entfernt. Nach Zugabe eines Enzym-gekoppelten Zytokin-spezifischen AKs und einem Waschschrift wird Substratlösung in die Vertiefungen pipettiert, die vom Enzym zu einem blauen Produkt umgesetzt wird. Die Farbintensität ist proportional zur Menge des im Anfangsschrift gebundenen Zytokins.

3 ERGEBNISSE

3.1 Charakterisierung der murinen LIGHT cDNS

3.1.1 Klonierung der murinen LIGHT vollen Länge cDNS

Da zu Beginn der Arbeit nur die cDNS Sequenz des humanen LIGHT Orthologs bekannt war (Genbank accession number NM_003807), wurde in einer PCR Reaktion unter Verwendung degenerierter Primer (s. Tabelle 2.5) ein Teilstück der murinen cDNS für LIGHT aus Maus-Splenozyten amplifiziert. Zur Klonierung der vollen Länge cDNS des murinen LIGHT wurden zwei "nested" RACE-PCRs (Rapid Amplification of cDNA Ends) durchgeführt, um die fehlenden 5' und 3' Enden zu definieren. Als Matrize für die PCR Reaktion diente eine cDNS-Bank aus muriner Milz (Marathon-Ready™ cDNA Kit, Clontech). Aus Abb. 3.1 ist die Lage der eingesetzten Primerpaare (s. Tabelle 2.6) zu ersehen.



Abb. 3.1: Schematische Darstellung der murinen LIGHT cDNS. Angegeben sind die relativen Längen der 5' und 3' untranslatierten Regionen (UTR), des offenen Leserahmens (ORF) und die in der Genbank anligierten Adaptoren. Pfeile zeigen Richtung und Lage der in der RACE-PCR verwendeten Primer.

Die Primerpaare AP1/GSP 5' bzw. GSP 3'/AP1 zur Amplifikation der 5' bzw. 3' Enden der cDNS lieferten nicht nur eine spezifische Bande, sondern auch eine Vielzahl unspezifischer Produkte, sichtbar als "Schmier" auf dem Agarosegel. Ausgehend von diesem Produktgemisch als Matrize konnte mit Hilfe der jeweils weiter innen liegenden Primerpaare AP2/NGSP 5' und NGSP 3'/AP2 zwei eindeutige Produkte amplifiziert und kloniert werden. Die nach Sequenzvergleich der Einzelklone definierte volle Länge cDNS des murinen LIGHT besitzt eine Länge von 1864 bp bestehend aus 104 bp 5' UTR, 717 bp ORF und 1043 bp 3' UTR. Über die gesamte Länge besitzen murines und humanes LIGHT eine Identität von 53 % auf cDNS Ebene. Die im Rahmen dieser Arbeit klonierte murine LIGHT cDNS Sequenz wurde im Nachhinein von zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander bestätigt (Genbank accession number AB029155 und AF227533).

3.1.2 Analyse der murinen LIGHT Proteinsequenz

Der offene Leserahmen des murinen LIGHT kodiert für ein Protein bestehend aus 239 Aminosäuren (s Abb. 3.2) und einer berechneten Proteingröße von 26,4 kDa. Zum humanen LIGHT (Genebank accession number O43557) weist das murine Protein eine Identität von 76 % auf Aminosäure Ebene auf. Analog zu den anderen Mitgliedern der TNF Superfamilie ist murines LIGHT ein Typ II Transmembranprotein mit C-terminaler extrazellulärer Rezeptorbindungsdomäne und einem innerhalb der engeren TNF/Lymphotoxin Familie konservierten Tyrosin an Position 173. Zu anderen Mitgliedern der murinen TNF-Liganden Superfamilie besitzt es Aminosäuresequenz Ähnlichkeiten von bis zu 33% (TNF α 33%, LT α 31%, LT β 30%, FasL 30%, TRAIL 30%, CD40L 29%).

mLIGHT	1	ME-SVVQPSVVFVVDGQTDIPFRRLEQNHRRRRCGTVQ-VSLALVLLL-GA	47
huLIGHT	1	MEE SVVRPSVVFVVDGQTDIPFTRLGRSHRRQSCS - VARVGLGLLLLLMGA	49
		<- Zytoplasmatischer Teil	TM Region
mLIGHT	48	GLATQGWFLRLRLHQRLGDIVAHLPDGGKGSWEKLIQDQRSHQANPAAHLT	97
huLIGHT	50	GLAVQGWFLLOLHWRLGEMVTRLPDGPAGSWEQLIQERRSHEVNPAAAHLT	99
		Rezeptor-Bindungsdomäne ->	
mLIGHT	98	GANASLIGIGGPLLWETRLGLAFLRGLTYHDGALV-TMEPGYYYYVYSKVQ	146
huLIGHT	100	GANSSLTGSGGPLLWETQLGLAFLRGLSYHDGALVVTKA-GYYYYIYSKVQ	148
mLIGHT	147	LSGVGCPQGLANGLPITHGLYKRTSRYPKELELLVSRRSPCGRANSS-RV	195
huLIGHT	149	LGGVGCPLGLAST--ITHGLYKRTPRYPEELELLVSQQSPCGRATSSSRV	196
mLIGHT	196	WWDSSFLGGVVHLEAGEEVVVRVPGNRLVVRPRDGTRSYFGAFMV*	239
huLIGHT	197	WWDSSFLGGVVHLEAGEEVRLDERLVRLRDGTRSYFGAFMV*	240

Abb. 3.2: Homologievergleich der murinen und humanen LIGHT Proteine. Die beiden Proteine sind zu 76 % identisch. Angegeben sind der N-terminale zytoplasmatische Bereich, die Transmembran (TM) Region und die C-terminale extrazytoplasmatische Rezeptor-Bindungsdomäne. In muriner und humaner Sequenz identische Aminosäuren sind grau unterlegt.

3.1.3 Rezeptorbindungseigenschaften des murinen LIGHT

Um funktionell nachzuweisen, dass es sich bei der klonierten cDNS tatsächlich um das murine Ortholog des humanen LIGHT handelt, wurde die Bindung von murinem LIGHT an HVEM und LT β Rezeptor untersucht, zwei für dieses Protein im humanen System beschriebene Rezeptoren (Mauri et al., 1998). Zu diesem Zweck wurde der ORF für murines LIGHT in den eukaryonten Expressionsvektor pcDNA3 kloniert und eine CHO Zelllinie generiert, die murines LIGHT stabil unter dem CMV-Promotor exprimiert (s 2.8.1). Diese Zelllinie wurde nun mit Ig-Fusionsproteinen für murines HVEM (K. Mink, S. Scheu und K. Pfeffer, unveröffentlicht) und LT β Rezeptor (Futterer et al., 1998) inkubiert und mit PE-konjugiertem anti human-IgG gegengefärbt (Abb. 3.3).

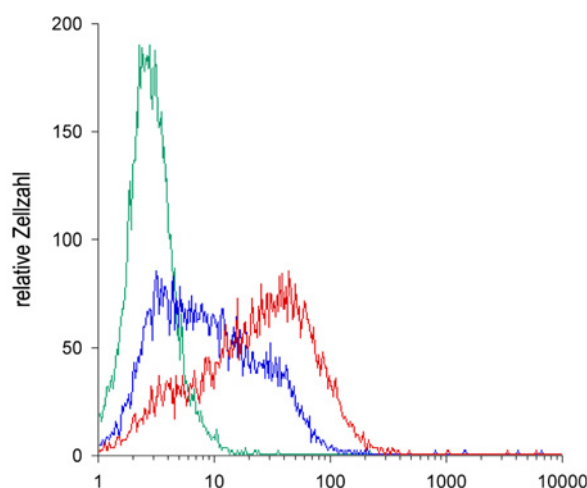


Abb. 3.3: Bindung von murinem LIGHT an HVEM und LT β Rezeptor. Stabil mit murinem LIGHT transfizierte CHO Zellen wurden mit murinem HVEM-Ig (rot) und LT β Rezeptor-Ig (blau) Fusionsprotein gefärbt und mit PE-konjugiertem anti human IgG AK im FACS detektiert. Als Kontrolle (grün) diente eine Färbung mit dem Sekundär-AK ohne vorherige Inkubation mit Fusionsprotein.

Sowohl murines HVEM als auch der murine LT β Rezeptor können an das hier exprimierte Homolog zu humanem LIGHT binden, was beweist, dass es sich dabei tatsächlich um das murine LIGHT Protein handelt. Um eine unspezifische Bindung der Fusionsproteine an CHO Zellen auszuschliessen, wurde eine stabil TNF α -exprimierende Zelllinie der gleichen Behandlung unterzogen, wobei keine Anfärbung zu beobachten war (Daten nicht gezeigt).

3.1.4 Expression von LIGHT in murinen Geweben

Die Analysen der Expression des murinen LIGHT in verschiedenen Geweben der adulten Maus und in unterschiedlichen Embryonalstadien wurden mittels standardisierter Gewebe-Northern Blots der Firma Clontech und einer LIGHT-spezifischen Sonde durchgeführt.

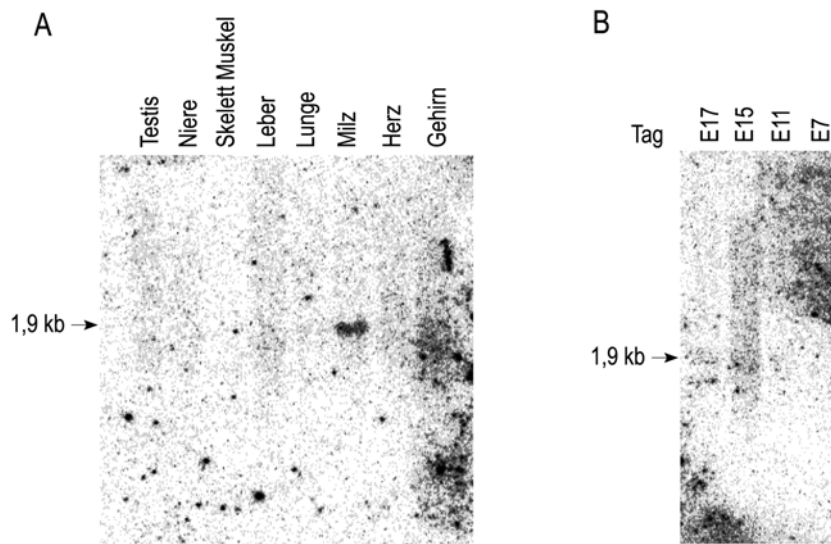


Abb. 3.4: Northern Blot Analyse der LIGHT mRNA Expression in adulten Maus-Geweben (A) und im murinen Embryo (B). E7 - 17, Tag 7 - 17 p.c.

Abb. 3.4 zeigt, dass LIGHT Transkripte in der adulten Maus ausschliesslich in Milzgewebe zu detektieren sind, das zugleich hier das einzig analysierte lymphatische Organ darstellt. Dies deckt sich mit der Beobachtung, dass LIGHT im Menschen hauptsächlich in lymphatischen Geweben nachzuweisen ist (Mauri et al., 1998). In murinem fötalen Gewebe ist LIGHT nur schwach exprimiert, beginnend mit Tag 15 p.c.

3.2 Charakterisierung des genomischen Lokus für murines LIGHT

3.2.1 Klonierung des genomischen Lokus für murines LIGHT

Als erster Schritt für die Klonierung des murinen genomischen Lokus für LIGHT wurde eine chromosomale BAC (Bacterial Artificial Chromosome) Genbank von ES Zellen des Mausstamms 129/Ola mittels einer LIGHT spezifischen Sonde hybridisiert (Genome Systems, USA). Diese Suche ergab einen positiven BAC Klon, der in einer Southern Blot Analyse auf die Vollständigkeit des LIGHT Lokus untersucht wurde. Hierfür wurde der BAC Klon mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut und das

Hybridisierungsmuster mit dem von muriner genomischer DNS verglichen (Abb. 3.5). Als Sonde wurde hier der 5' terminale Bereich der murinen LIGHT cDNS gewählt (s. Tabelle 2.16).

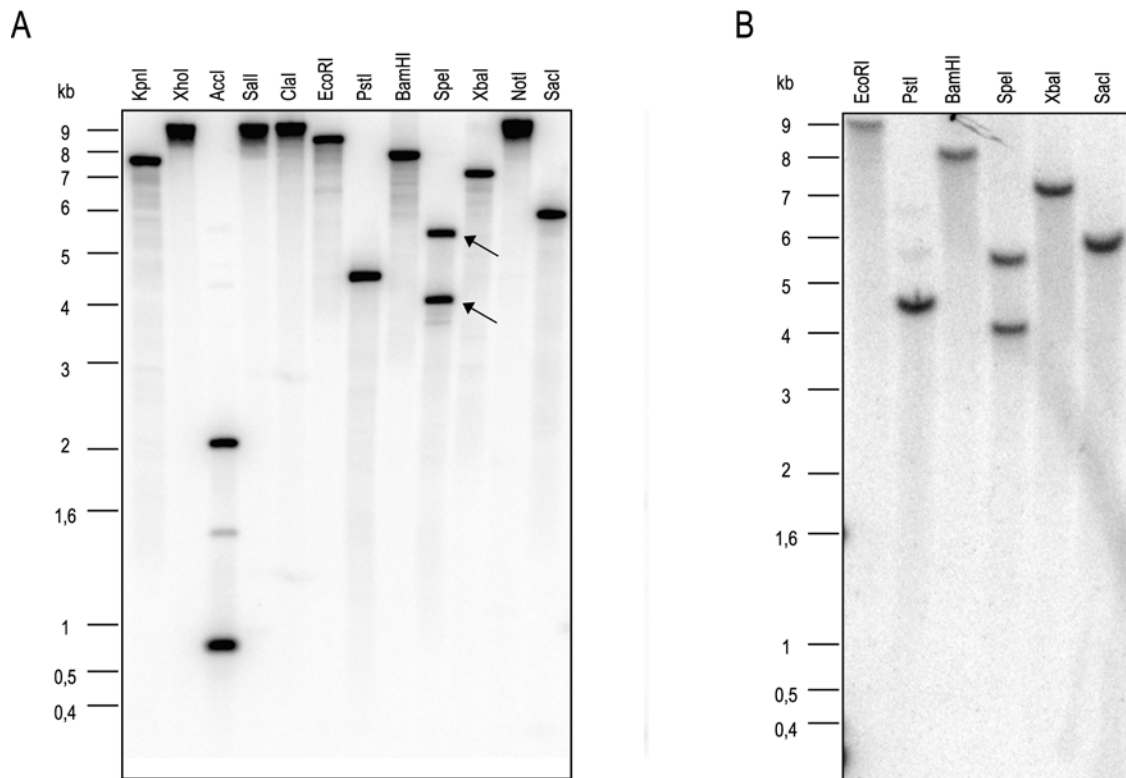


Abb. 3.5: Southern Blot Hybridisierung des BAC Klons (A) und muriner genomischer DNS (B) mit einer LIGHT spezifischen Sonde. Der BAC Klon und die murine genomische DNS wurden mit den angegebenen Restriktionsenzymen verdaut und nach elektrophoretischer Auftrennung auf Nylonmembranen geblottet. Die Hybridisierung erfolgte mit einer Sonde spezifisch für den 5' terminalen Bereich der vollen Länge cDNS für murines LIGHT. Die mit Pfeilen gekennzeichneten Banden wurden subkloniert.

Da das Bandenmuster zwischen genomischem und BAC Southern genau übereinstimmt, kann angenommen werden, dass das BAC Fragment den gesamten *light* Locus beinhaltet. Ausserdem kann aus dem genomischen Southern Blot entnommen werden, dass das *light* Gen nur in einfacher Kopie im Genom vorhanden ist und keine Pseudogene hierfür existieren. Die in Abb. 3.5 mit Pfeilen gekennzeichneten BAC Fragmente wurden in den pBluescript Vektor kloniert (s. Tabelle 2.16) und anschliessend sequenziert. Auf diese Weise wurden insgesamt 9,8 kb des genomischen Locus für LIGHT definiert und festgestellt, dass in Analogie zu anderen Mitgliedern der TNF Liganden Familie, wie $TNF\alpha$, $LT\alpha$ und $LT\beta$, das *light* Gen aus drei kleineren (317 bp, 37 bp, 42 bp) und einem größeren Exon (1468 bp) besteht, die wiederum durch drei Introns (1917 bp, 302 bp, 1620 bp) von einander getrennt werden. Mittels einer PCR (Primer mLIGHT SpeI as und se, s. Tabelle 2.10) und anschliessender Klonierung und Sequenzierung des PCR Produkts wurde bestätigt, dass die beiden SpeI-Fragmente im Genom direkt aneinander anschliessen und nicht durch ein in der Southern Hybridisierung nicht detektiertes Fragment getrennt werden.

3.2.2 Chromosomale und subchromosomale Lokalisation des murinen LIGHT Gens

Zur Untersuchung der chromosomalen Lokalisation des murinen LIGHT wurde eine Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) durchgeführt (Genome Systems, USA). Hierfür wurden murine Metaphase Chromosomen zunächst mit den Digoxigenin-markierten LIGHT-spezifischen genomischen Subklonen Spe 4,0 kb und Spe 5,8 kb hybridisiert. Nach Inkubation mit einem Fluoreszenz-markierten anti-Digoxigenin AK und einer DAPI Gegenfärbung erfolgte die mikroskopische Untersuchung. Das Ergebnis der Hybridisierung ist in Abb. 3.6 dargestellt. Positive Fluoreszenzsignale für LIGHT fanden sich in einem Abstand von 52 % von der heterochromatischen-euchromatischen Grenze auf Chromosom 17. Diese Region entspricht der Bande 17C-D. Zusätzlich wurde eine Kohybridisierung mit einer Sonde durchgeführt, die spezifisch für die telomere Region von Chromosom 17 ist.

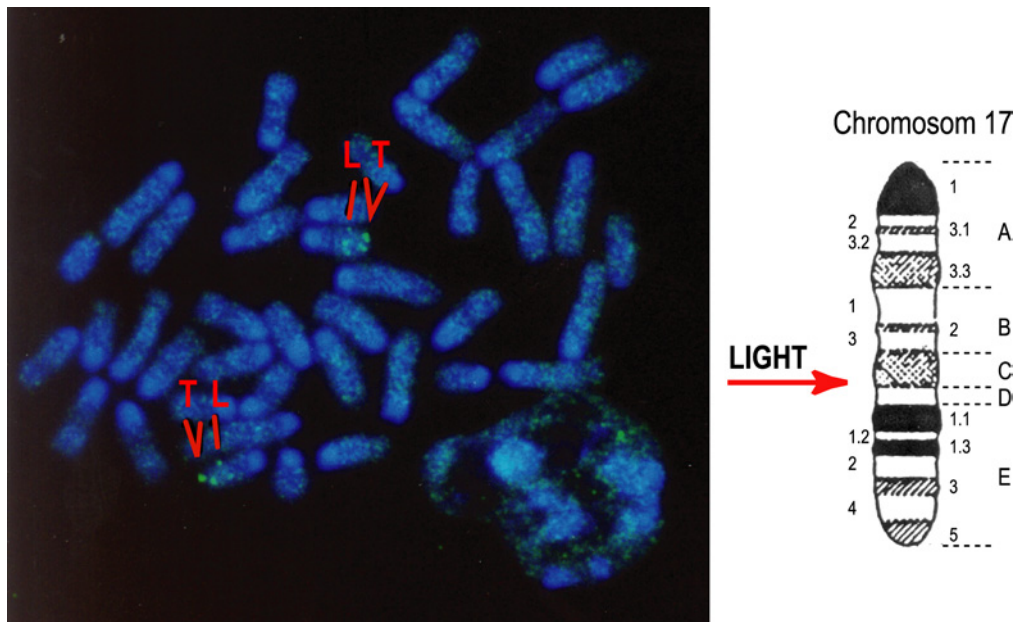


Abb. 3.6: Chromosomale Lokalisation von LIGHT. Murine Metaphase Chromosomen wurden mit Digoxigenin-markierter LIGHT DNS hybridisiert. Die Detektion erfolgte durch einen Fluoreszenz-markierten anti-Digoxigenin AK. L, LIGHT Signal; T, Signal für die telomere Region von Chromosom 17.

Im Rahmen der Rückkreuzung von C57BL/6 LIGHT defizienten Mäusen auf einen BALB/c kongenen Hintergrund (s. 2.4.3) wurde der MHC Haplotyp der F1 Generation mittels FACS Analyse überprüft. Aus der Anzahl der geborenen Tiere mit entsprechendem Genotyp (Tabelle 3.1) lässt sich statistisch die Entfernung des *light* Gens vom MHC Locus ableiten, da in der Maus beide auf Chromosom 17 liegen.

**Tabelle 3.1: LIGHT und MHC Genotypen der Nachkommen aus der Verkreuzung
LIGHT^{+/-} H-2^{bd} x LIGHT^{+/-} H-2^{bd}**

Nachkommen analysiert auf LIGHT, I-A und H-2K (75 Nachkommen)					Nachkommen analysiert auf LIGHT, I-A und H-2D (52 Nachkommen)				
Genotyp			Anzahl an Nachkommen	Prozentualer Anteil	Genotyp			Anzahl an Nachkommen	Prozentualer Anteil
LIGHT	I-A	H-2K			LIGHT	I-A	H-2D		
+/+	hh	hh	0	-	+/+	hh	hh	0	-
+/+	bb	bd	0	-	+/+	bb	bd	0	-
+/+	bb	dd	0	-	+/+	bb	dd	0	-
+/+	bd	bb	0	-	+/+	bd	bb	0	-
+/+	bd	bd	5	6.67%	+/+	bd	bd	4	7.69%
+/+	bd	dd	0	-	+/+	bd	dd	0	-
+/+	dd	bb	0	-	+/+	dd	bb	0	-
+/+	dd	bd	0	-	+/+	dd	bd	0	-
+/+	dd	dd	24	32.00%	+/+	dd	dd	5	9.62%
+/-	bb	bb	1	1.33%	+/-	bb	bb	5	9.62%
+/-	bb	bd	0	-	+/-	bb	bd	1	1.92%
+/-	bb	dd	0	-	+/-	bb	dd	0	-
+/-	bd	bb	0	-	+/-	bd	bb	0	-
+/-	bd	bd	24	32.00%	+/-	bd	bd	23	44.23%
+/-	bd	dd	0	-	+/-	bd	dd	0	-
+/-	dd	bb	0	-	+/-	dd	bb	0	-
+/-	dd	bd	0	-	+/-	dd	bd	0	-
+/-	dd	dd	3	4.00%	+/-	dd	dd	3	5.77%
-/-	bb	bb	16	21.33%	-/-	bb	bb	9	17.31%
-/-	bb	bd	0	-	-/-	bb	bd	0	-
-/-	bb	dd	0	-	-/-	bb	dd	0	-
-/-	bd	bb	0	-	-/-	bd	bb	0	-
-/-	bd	bd	2	2.67%	-/-	bd	bd	2	3.85%
-/-	bd	dd	0	-	-/-	bd	dd	0	-
-/-	dd	bb	0	-	-/-	dd	bb	0	-
-/-	dd	bd	0	-	-/-	dd	bd	0	-
-/-	dd	dd	0	-	-/-	dd	dd	0	-

Addiert man alle Rekombinationsereignisse zwischen den genomischen Loci für LIGHT und MHC Klasse II Protein I-A und ermittelt daraus den prozentualen Anteil, so erhält man eine Rekombinationshäufigkeit von 10,24 %. (Abb. 3.7). Dies entspricht umgerechnet einer Entfernung von mindestens 10,24 cM auf chromosomaler Ebene.

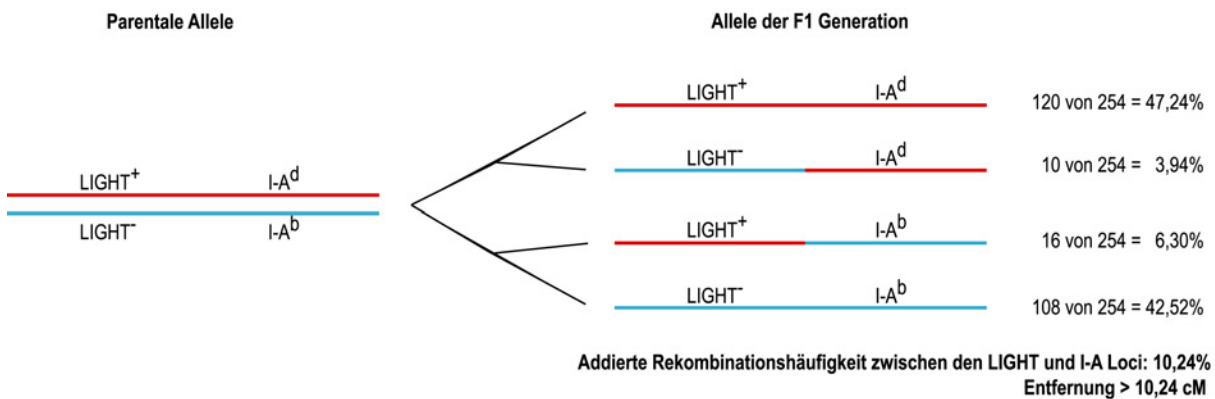


Abb. 3.7: Rekombinationsereignisse zwischen den genomischen Loci für LIGHT und I-A. Addiert man die prozentuale Häufigkeit der beiden möglichen Rekombinationsereignisse, erhält man die genomische Entfernung der beiden Loci in cM.

Zusätzlich ist aus Tabelle 3.1 zu entnehmen, dass es häufiger zu Rekombinationsereignissen zwischen den LIGHT und H-2D Loci kommt als zwischen den LIGHT und H-2K Loci. Es ist daher wahrscheinlich, dass *light* auf der H-2K proximalen Seite des MHC Lokus auf Chromosom 17 liegt. Zusammenfassend lässt sich die in Abb. 3.8 gezeigte physikalische Karte der für LIGHT und den MHC Lokus relevanten Bereiche des murinen Chromosom 17 zeichnen.

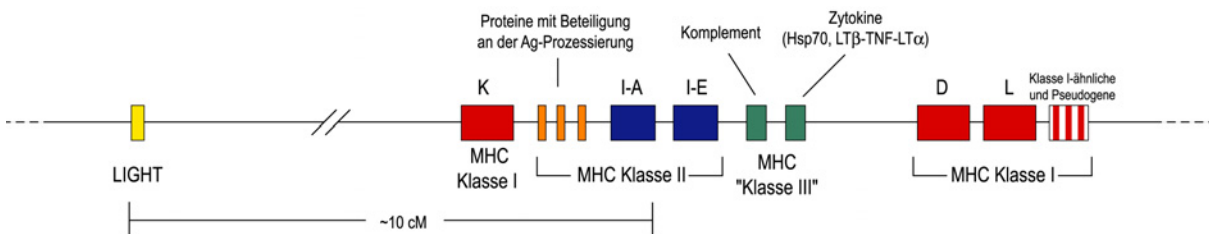


Abb. 3.8: Physikalische Ausschnittskarte des murinen Chromosom 17 mit der relativen Lage des *light* Gens und des MHC Lokus.

3.3 Generierung einer LIGHT defizienten Mausmutante

Die gezielte Mutagenese von Genen in der Keimbahn von Mäusen ermöglicht die Untersuchung der *in vivo* Funktion dieser Gene und deren Rolle im Immunsystem. Um die Funktion von LIGHT im Gesamtorganismus analysieren zu können, wurde durch homologe Rekombination in pluripotenten embryonalen Stammzellen eine LIGHT defiziente Mausmutante generiert.

3.3.1 Klonierung des LIGHT-Rekombinationsvektors

Klonierungsstrategie

Der LIGHT-Rekombinationsvektor wurde in pBlueskript so konstruiert, dass ein 4,5 kb Fragment des genomischen *light* Locus, das für den kompletten Leserahmen des LIGHT Proteins kodiert, durch eine Neomycin-Resistenz Kasette ersetzt wurde (Abb. 3.9). Um eine korrekte Rekombination des Vektors zu ermöglichen, ist die Kasette von beiden Seiten von unterschiedlich langen homologen Bereichen des LIGHT Locus flankiert, die als "kurzer Arm" und als "langer Arm" bezeichnet werden. Der 2,8 kb umspannende lange Arm liegt 5' der Neomycin-Kasette. Der kurze Arm hat eine Länge von 800 bp und ist 3' der Resistenz-Kasette einkloniert. Das Gen für die Herpes simplex virus Thymidinkinase (HSV-TK) wurde 5' nach der deletierten Region in den Vektor eingesetzt. Die Linearisierung erfolgte an einer *KpnI*-Schnittstelle 800 bp 3' der Neomycin-Resistenz Kasette ("kurzer Arm").

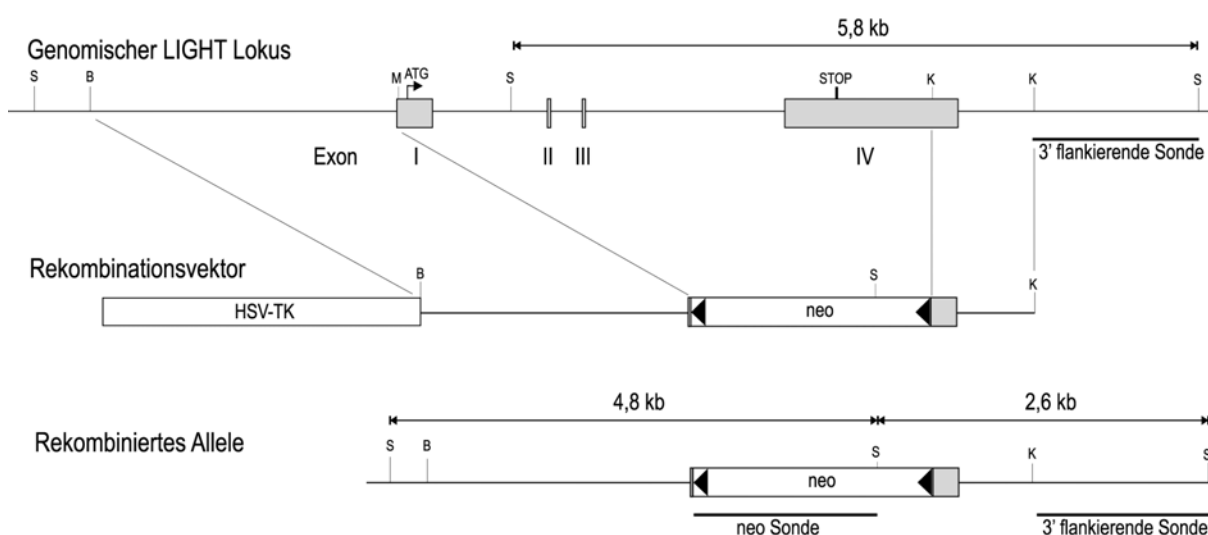


Abb. 3.9: Inaktivierung des *light* Gens in embryonalen Stammzellen. Der gesamte ORF für LIGHT wird durch den Einbau der Neomycin-Resistenz Kasette deletiert. Gezeigt sind hier die Restriktionskarten des Genomischen Locus, des Rekombinationsvektors und des rekombinierten Allels. Die Positionen des Translationsstarts, des Stop-Codons, der neo Sonde und der 3' flankierenden Sonde sind angegeben. B, *BamHI*; K, *KpnI*; M, *MfeI*; S, *SpeI*.

Neomycin-Resistenz Kasette

Der Rekombinationsvektor muß aus technischen Gründen einen Marker zur Positivselektion enthalten. Die in dieser Arbeit verwendete Neomycin Phosphotransferase erlaubt das Wachstum von rekombinierten ES Zell Klonen in Gegenwart des Antibiotikums Genetecin (G418). Die Neomycin-Resistenz Kasette ist an beiden Seiten von loxP (locus of X-ing over P1 phage) Erkennungssequenzen flankiert, was ihre spätere CRE (causes recombination) vermittelte Deletion in LIGHT defizienten Mäusen erlaubt, z.B. durch Verpaarung mit der ubiquitär CRE exprimierenden Deleter Maus (Sternberg et al., 1981; Rajewsky et al., 1996; Sternberg and Hamilton, 1981; Sternberg et al., 1986). Bei der Klonierung des LIGHT Rekombinationsvektors wurde die Neomycin Kasette "in antisense" Orientierung eingebaut.

Herpes Simplex Virus Thymidinkinase (HSV-TK) Kasette

Der Einbau der HSV-TK Kasette in den Rekombinationsvektor erlaubt die Negativselektion aller ES Zell Klone, bei denen der Rekombinationsvektor ungerichtet und nicht über homologe Rekombination in das Genom inseriert wurde. Bei ungerichteter Rekombination wird mit hoher Effizienz auch heterologe DNS, wie hier die HSV-TK Kasette, ins Genom eingebaut. Sie sind daher sensitiv für die Phosphorylierung und den nachfolgenden Einbau des Thymidinanalogons Gancyclovir in die DNS, was zur Blockade der DNS-Replikation führt. Da bei homolog rekombinierten ES Zell Klonen die HSV-TK Kasette nicht in das Genom integriert wird und die endogene mammalische Thymidinkinase Gancyclovir nicht aktivieren kann, sind diese dagegen resistent (Wurst and Joyner, 1993).

3.3.2 Generierung von LIGHT defizienten embryonalen Stammzellen

Erzeugung von LIGHT^{+/-} ES Zellen durch homologe Rekombination

Der linearisierte Rekombinationsvektor wurde in E14.1 embryonale Stammzellen (129/Ola) elektroporiert und die so transfizierten ES Zellen auf embryonalen Fibroblasten in Anwesenheit von G418 und Gancyclovir kultiviert. Am Tag 10 nach Beginn der Antibiotika-Selektion konnten 242 resistente ES Zell Klone in 96-well Platten gepickt und expandiert werden. Die eine Hälfte der Zellen wurde eingefroren, die zweite Hälfte zur Identifizierung korrekt rekombinierter Klone mittels "Screening PCR" getestet.

Identifizierung korrekt rekombinierter ES-Zell Klone mittels "Screening-PCR"

Die doppelt resistenten Klone wurden mit Hilfe der "Screening-PCR" auf korrekte homologe Rekombination untersucht. Kolonien aus einer vollbewachsenen 96-well Platte wurden auf eine 96-Thermowell PCR Platte überführt und dort lysiert. Mit diesem Lysat wurde eine PCR durchgeführt, wobei ein Primer im 3'-Bereich außerhalb des Konstrukts im LIGHT Locus (screen kA as, Tabelle 2.9), der andere innerhalb der Neomycin-Resistenz Kasette bindet (pneo 1, Tabelle 2.9). Auf diese Weise erfolgt die Amplifikation des "kurzen Arms" des Rekombinationsvektors, allerdings nur bei korrekter homologer Rekombination. Um schwache oder nicht eindeutige Signale im Agarosegel zu überprüfen, wurden die Gele auf Nylonmembranen geblottet und mit dem "kurzen Arm" als Sonde hybridisiert. Positive Klone wurden zum einen expandiert für die DNA Gewinnung zu Southern Blot Analyse, zum anderen eingefroren.

Southern Blot Analyse der homolog rekombinierten ES Zellen

Die durch die "Screening-PCR" identifizierten Klone wurden nun mittels Southern Blot überprüft. Um die Menge von Wildtyp DNS, die das Ergebnis verfälschen würde, möglichst gering zu halten, erfolgte die Anzucht der zu testenden ES Zell Klone auf Zellkulturplatten ohne embryonale Fibroblasten. Die aufgereinigte genomische DNS wurde mit *SpeI* verdaut und nach einem Agarosegellauf auf Nylonmembran geblottet. Die Hybridisierung erfolgte mit der 3' flankierenden Sonde, die außerhalb des im Rekomb-

binationsvektor vorhandenen genomischen Bereichs bindet (Abb. 3.9). Wie in Abb. 3.10 gezeigt ergab das WT Allel eine Bandengröße von 5,8 kb, was der Größe des entsprechenden subklonierten genomischen Fragments entspricht. Das Hybridisierungssignal in Höhe 2,6 kb ist spezifisch für das mutierte Allel. Von denen in der "Screening PCR" als positiv gewerteten Kandidaten wiesen nur die Klone #3A5 und #1D1 die zu erwartenden Hybridisierungssignale in gleicher Intensität auf und wurden als korrekt rekombinierte Klone identifiziert. Die Hybridisierung mit der 3' flankierenden Sonde schliesst allerdings nicht aus, dass zusätzlich zur homologen Rekombination weitere zufällige Integrationen ins Genom stattgefunden haben. Um dies auszuschliessen, wurde die *SpeI* verdauete genomische DNS mit einer neo Sonde hybridisiert. Aus Abb. 3.10 ist ersichtlich, dass nur bei den Klonen #3A5 und #1D1 ein einziges Hybridisierungssignal in der korrekten Größe von 4,8 kb detektierbar war, nicht aber bei den falsch PCR-positiven Klonen und der Kontroll-WT ES Zell DNS. Die G418 Resistenz der falsch positiven Klone #1E1 und #2A2 ist vermutlich durch ein zufälliges Rekombinationsereignis der Neomycin Resistenzkassette in das Genom an einer Stelle zu erklären, die im Agarosegel zu hoch läuft, um in der Hybridisierung eindeutig detektierbar zu sein.

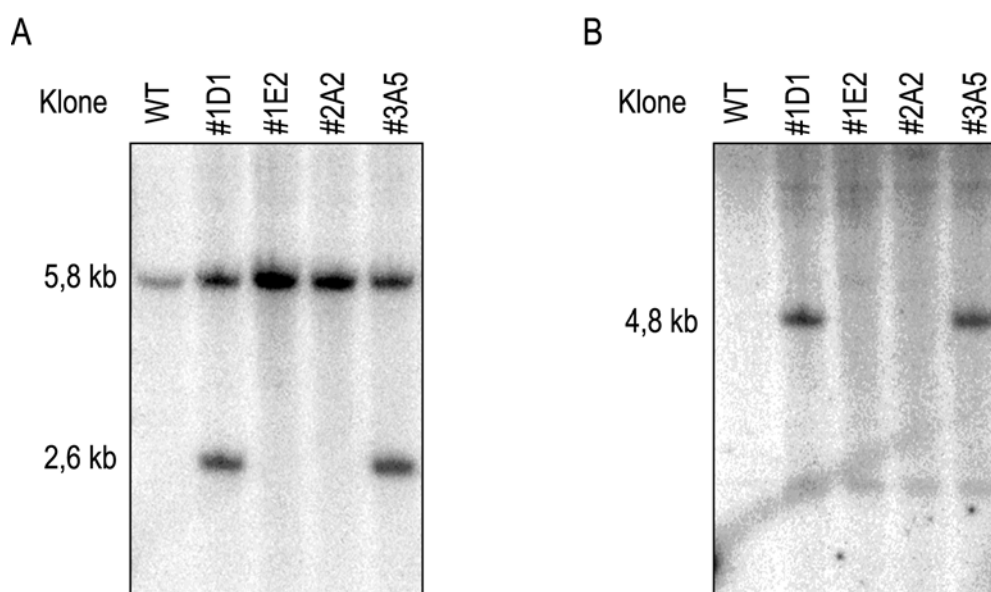


Abb. 3.10: Southern Blot Analyse der in der "Screening PCR" positiven ES Zell Klone nach *SpeI*-Verdau. (A) Hybridisierung mit der 3' flankierenden Sonde. Die Klone #1D1 und #3A5 zeigen das 5,8 kb große WT Signal und das 2,6 kb große KO Signal in vergleichbarer Intensität und wurden als korrekt rekombiniert identifiziert. (B) Hybridisierung mit der neo Sonde. Die Klone #1D1 und #3A5 zeigen ein einziges Signal in Höhe 4,8 kb, wodurch eine Mehrfachintegration des Rekombinationsvektors im Genom ausgeschlossen ist. Bei den Klonen #1E2 und #2A2 handelt es sich um falsch positive Klone. WT, E14.1 WT Kontrolle

3.3.3 Generierung eines LIGHT defizienten Mausstammes aus rekombinierten ES Zellen

Die beiden unabhängig voneinander erzeugten homolog rekombinierten ES-Zell Klone #1D1 und #3A5 wurden in Blastozysten von C57BL/6 Spendertieren injiziert (Abb. 3.11) und anschliessend in pseudoschwangere F1 Weibchen aus einer C57BL/6 x BALB/c Kreuzung transferiert. Der Grad des Chimärismus der Nachkommen kann bei dieser Kombination von ES Zell- bzw. Blastozysten-Donorstamm

anhand der agoutifarbenen Fellzeichnung abgeschätzt werden. Hochchimäre Nachkommen wurden anschliessend mit C57BL/6 Mäusen verpaart, und auf Keimbahntransmission des mutierten LIGHT-Allels getestet. Die Wahrscheinlichkeit, dass das mutierte Allel durch die Keimbahn transmittiert wird, liegt bei 50%.

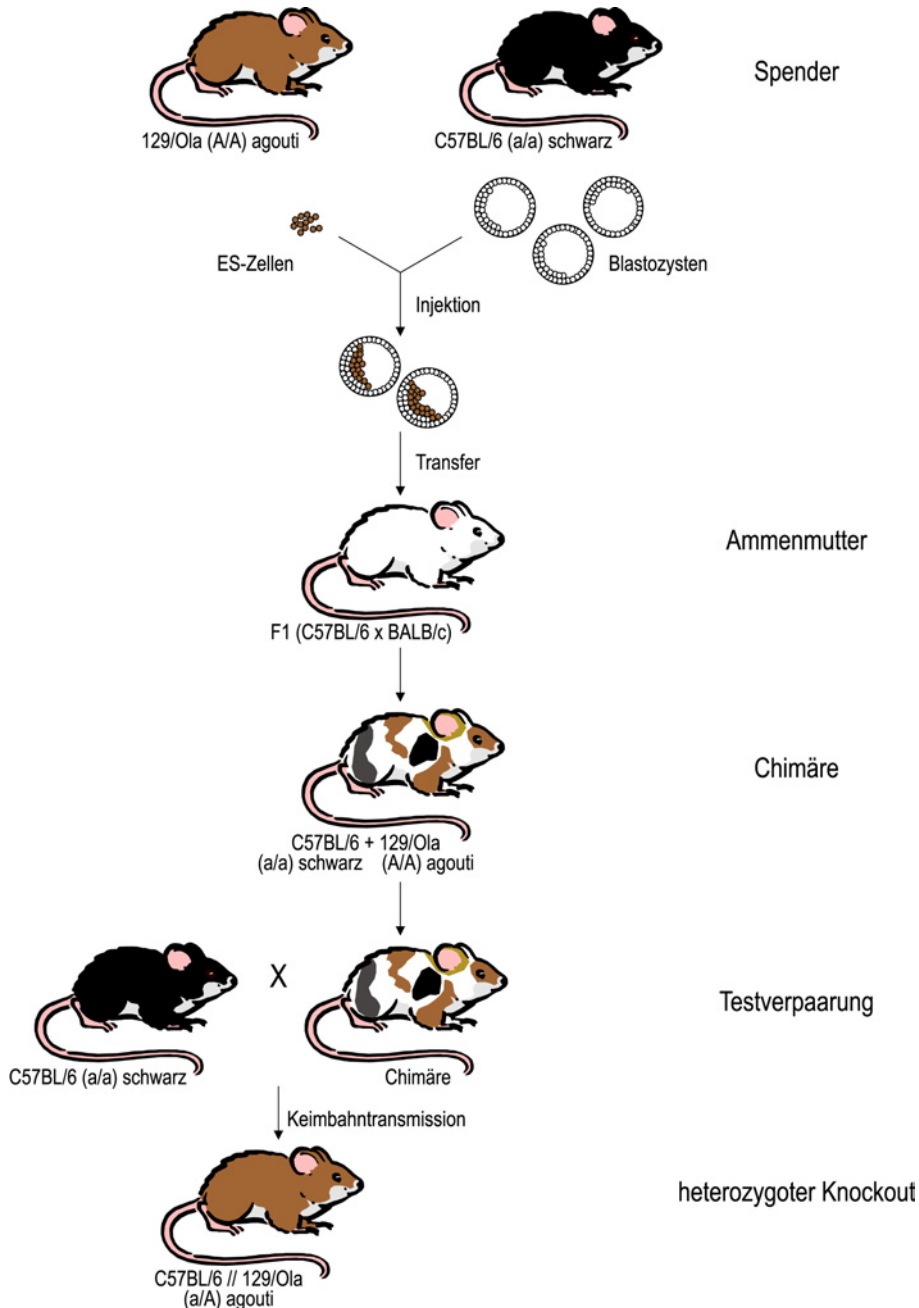


Abb. 3.11: Schematische Darstellung der Generierung gendefizienter Mäuse aus homolog rekombinierten ES Zellen durch Blastozysteninjektion. Der Anteil der mutierten ES Zellen an der Gesamtzellmasse des Organismus kann am Anteil der agoutifarbenen Fellzeichnung der Chimären abgeschätzt werden. Die Fellfarbe der Nachkommen aus der Testverpaarung der Chimären mit C57BL/6 Mäusen gibt Aufschluß über die Keimbahntransmission eines Allels aus den mutierten ES Zellen. Das agouti Allel der 129/Ola ES Zellen ist dominant über das Allel für die schwarze Fellfarbe von C57BL/6 Mäusen.

Von agoutifarbenen Nachkommen der Testverpaarung von Chimären mit C57BL/6 Mäusen wurden Schwanzspitzen-Biopsien genommen und mittels Typisierungs-PCR (Primer s. Tabelle 2.11) und Southern Blot Analyse auf Vorhandensein des mutierten LIGHT-Allels getestet. Chimären, die von den beiden ES Zell Klonen abgeleitet waren, transmittierten das mutierte LIGHT-Allel in der Keimbahn. Die so erhaltenen heterozygoten Tiere wurden untereinander verpaart und die Nachkommen mittels PCR und Southern Blot genotypisiert (Abb. 3.12).

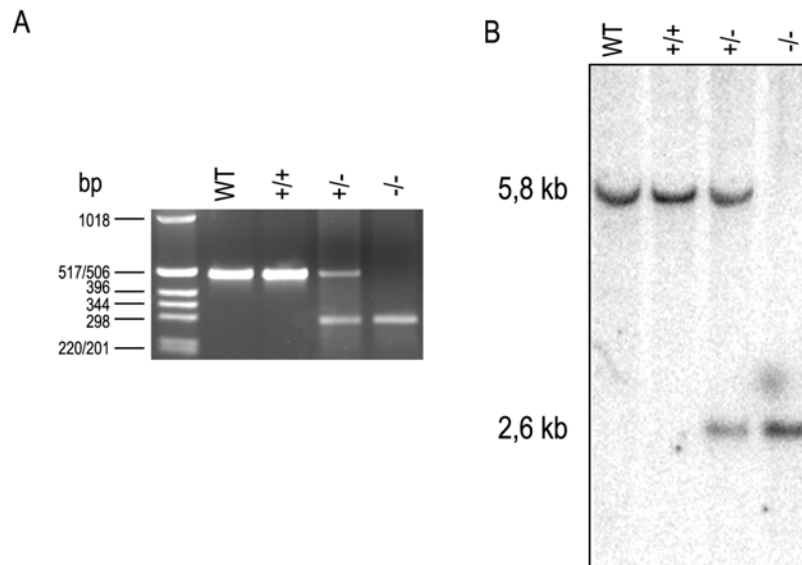


Abb. 3.12: PCR und Southern Blot Analyse von drei Nachkommen aus der LIGHT-heterozygoten Verpaarung.
 (A) PCR Analyse von drei Nachkommen und einer WT Kontrolle mit LIGHT-Typisierungsprimern. KO, PCR-Signal für das mutierte Allel; WT, PCR-Signal für das LIGHT WT Allel; 1kb, DNS-Größenstandard.
 (B) Southern Blot Analyse der DNS Proben mit der 3' flankierenden Sonde (analog Abb. 3.10 A).

LIGHT^{-/-} Mäuse wurden mit der erwarteten Mendelschen Frequenz geboren, erschienen gesund und waren fertil. In allen durchgeführten Versuchen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen WT und LIGHT^{+/-} Mäusen, was zeigt, dass ein intaktes *light* Allel das mutierte funktionell substituieren kann. Weiterhin ergaben Experimente mit Mäusen, die von den beiden ES-Zell Klonen abstammten, vergleichbare Ergebnisse, sodass der beschriebene Phänotyp auf die Abwesenheit von LIGHT und nicht auf einen unspezifischen Defekt eines ES-Zell Klones zurückzuführen ist.

3.3.4 Nachweis der erfolgreichen Inaktivierung des *light* Gens

Für den Nachweis der erfolgreichen Inaktivierung des *light* Gens, wurden PMA/Ionophor-stimulierte Splenozyten mittels RT-PCR und Northern Blot auf die Anwesenheit von LIGHT mRNA untersucht. Hierzu wurden Splenozyten aus WT, LIGHT^{+/-} und LIGHT^{-/-} Mäusen präpariert (s. 2.8.3) und jeweils die eine Hälfte der Zellen für 4 h mit PMA (10 ng/ml) und Calcium Ionophor (200 ng/ml) stimuliert, während die andere Hälfte unbehandelt belassen wurde. Nach Isolierung der gesamtzellulären RNS (s. 2.7.10) wurde ein Teil in cDNS umgeschrieben (s. 2.7.11), der Rest für die Northern Blot Analyse eingesetzt

(s. 2.7.13). Abb. 3.13 zeigt, dass in stimulierten LIGHT^{+/+} und LIGHT^{+/-} Zellen mRNS für LIGHT nachweisbar ist (Primer und Sonde s. Tabelle 2.8 und Tabelle 2.16), jedoch nicht in Splenozyten aus LIGHT homozygot defizienten Mäusen. TNF α mRNS (Primer und Sonde s. Tabelle 2.8 und Tabelle 2.16) wird in Splenozyten aus allen drei Genotypen nach Stimulation hochreguliert. Als Beladungskontrolle diente im Falle der RT-PCR β -Aktin (Primer s. Tabelle 2.8), im Falle des Northern Blots die 28S und 18S rRNS nach Methylenblau Färbung. Dieses Ergebnis beweist, dass das *light* Gen erfolgreich inaktiviert wurde.

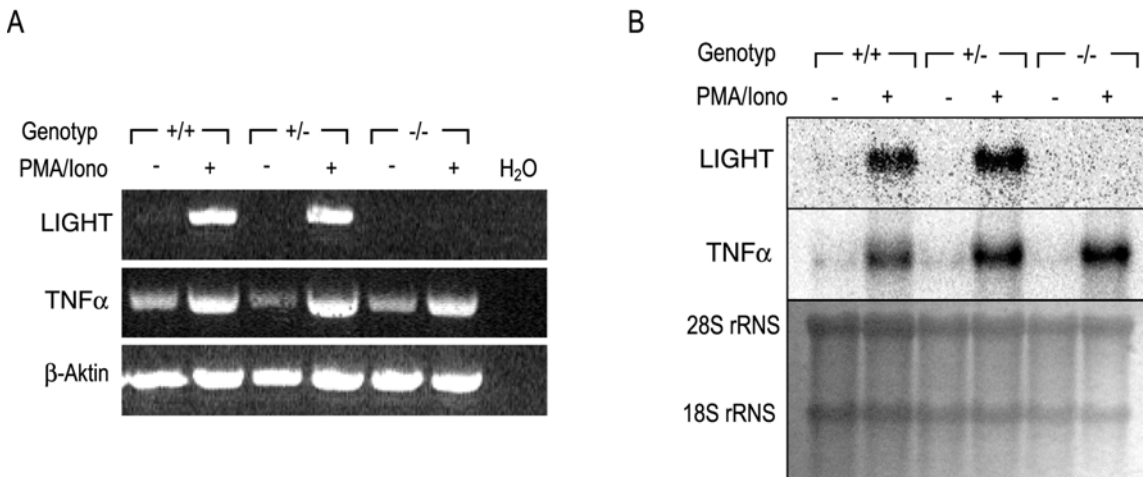


Abb. 3.13: Abwesenheit von LIGHT mRNS in LIGHT^{-/-} Splenozyten. Mit unbehandelten und PMA/Ionophor stimulierten Splenozyten wurden (A) RT-PCR Analysen und (B) Northern Blot Analysen durchgeführt zur Detektion von mRNS für LIGHT, TNF α (Stimulationskontrolle) und β -Aktin bzw. 28S und 18S rRNA (Beladungskontrollen).

Das *light* Gen liegt in der Maus auf Chromosom 17 (s. 3.2.2) und im Menschen auf Chromosom 19 (Granger et al., 2001) jeweils in unmittelbarer Nachbarschaft zu CD70 (CD27-L), einem weiteren TNF Liganden Familienmitglied. Um eine Dysregulation dieses nächstgelegenen Locus auszuschließen, wurde eine RT-PCR zur Detektion der CD70 mRNS (Primer s. Tabelle 2.8) mit unbehandelten und PMA/Ionophor-stimulierten LIGHT^{+/+} und LIGHT^{-/-} Splenozyten durchgeführt. Wie aus Abb. 3.14 ersichtlich, ist mRNS für CD70 in WT und LIGHT defizienten Tieren in unstimulierten Zellen vorhanden und wird auch in vergleichbarer Weise durch PMA/Ionophor induziert. Somit lassen sich die beobachteten Unterschiede der LIGHT^{-/-} Mäuse im Vergleich zu WT Mäusen ausschliesslich auf die Inaktivierung des LIGHT Gens zurückführen und nicht auf eine zusätzliche Dysregulation des benachbarten Gen Locus.

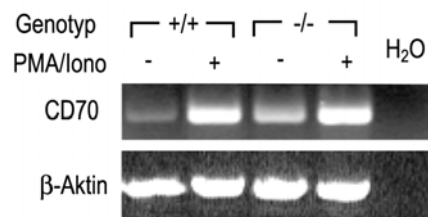


Abb. 3.14: CD70 mRNS Expression in LIGHT^{-/-} Splenozyten. Unbehandelte und PMA/Ionophor stimulierte Splenozyten aus WT und LIGHT^{-/-} Mäusen wurden mittels RT-PCR auf Transkription von CD70 mRNS untersucht. Als Beladungskontrolle diente β -Aktin.

3.4 Analyse des Phänotyps von LIGHT defizienten Mäusen und Zellen

3.4.1 Morphologie und Funktion lymphatischer Organe in LIGHT defizienten Mäusen

Mitglieder der TNF Liganden und Rezeptor Superfamilien sind funktionell an der Organogenese lymphatischer Organe beteiligt. $LT\beta$ Rezeptor defiziente Mäuse besitzen keinerlei periphere oder mesenteriale Lymphknoten oder Peyer'sche Plaques und zeigen eine größtenteils zerstörte Milzarchitektur (Futterer et al., 1998). In $LT\beta^{\Delta/\Delta}$ und $LT\beta^{-/-}$ Mäusen, die durch CRE-loxP vermittelte Deletion oder durch Austausch gegen eine Neomycin-Resistenz Kassetten kein funktionelles *ltβ* Gen besitzen und daher kein $LT\alpha_1\beta_2$ Heterotrimer bilden können, sind organisierte mesenteriale und in einigen Fällen auch zervikale Lymphknoten erhalten (Alimzhanov et al., 1997; Koni et al., 1997). Ausserdem bleibt in der Milz von $LT\beta^{\Delta/\Delta}$ und $LT\beta^{-/-}$ Mäusen die T/B Zell Kompartimentalisierung weitgehend intakt. Aufgrund dieser unvollständigen Entwicklungsdefekte wurde auf eine Beteiligung von LIGHT, als zweiter Ligand für den $LT\beta$ Rezeptor, an der Genese von sekundären lymphatischen Organen und deren Mikroarchitektur spekuliert. Aus diesem Grund waren die Morphologie und Funktion der lymphatischen Organe eine der ersten Gesichtspunkte nach denen die LIGHT defiziente Maus untersucht wurde.

Mäuse mit einer homozygoten Defizienz für LIGHT entwickeln ein komplettes Set von primären und sekundären lymphatischen Organen, einschliesslich peripherer und mesenterialer Lymphknoten und Peyer'schen Plaques (Daten nicht gezeigt). FACS Analysen von Milz, Lymphknoten, Thymus, Knochenmark und peripheren Blut Leukozyten ergaben normale Zellzahlen für T, B, Dendritische und NK Zellen, Monozyten und Granulozyten (Daten nicht gezeigt). Auch die basale Konzentration der Immunglobulin Subklassen im Serum war auf normalem Niveau in $LIGHT^{-/-}$ Mäusen.

Histologische Untersuchung sekundärer lymphatischer Organe in $LIGHT^{-/-}$ Mäusen

In Vergleichen der Mikroarchitektur von Thymus, Lymphknoten, Milz und Peyer'schen Plaques waren keine signifikanten morphologischen Unterschiede zwischen WT und LIGHT defizienten Tieren ersichtlich (Abb. 3.15, Abb. 3.16 und nicht gezeigte Daten).

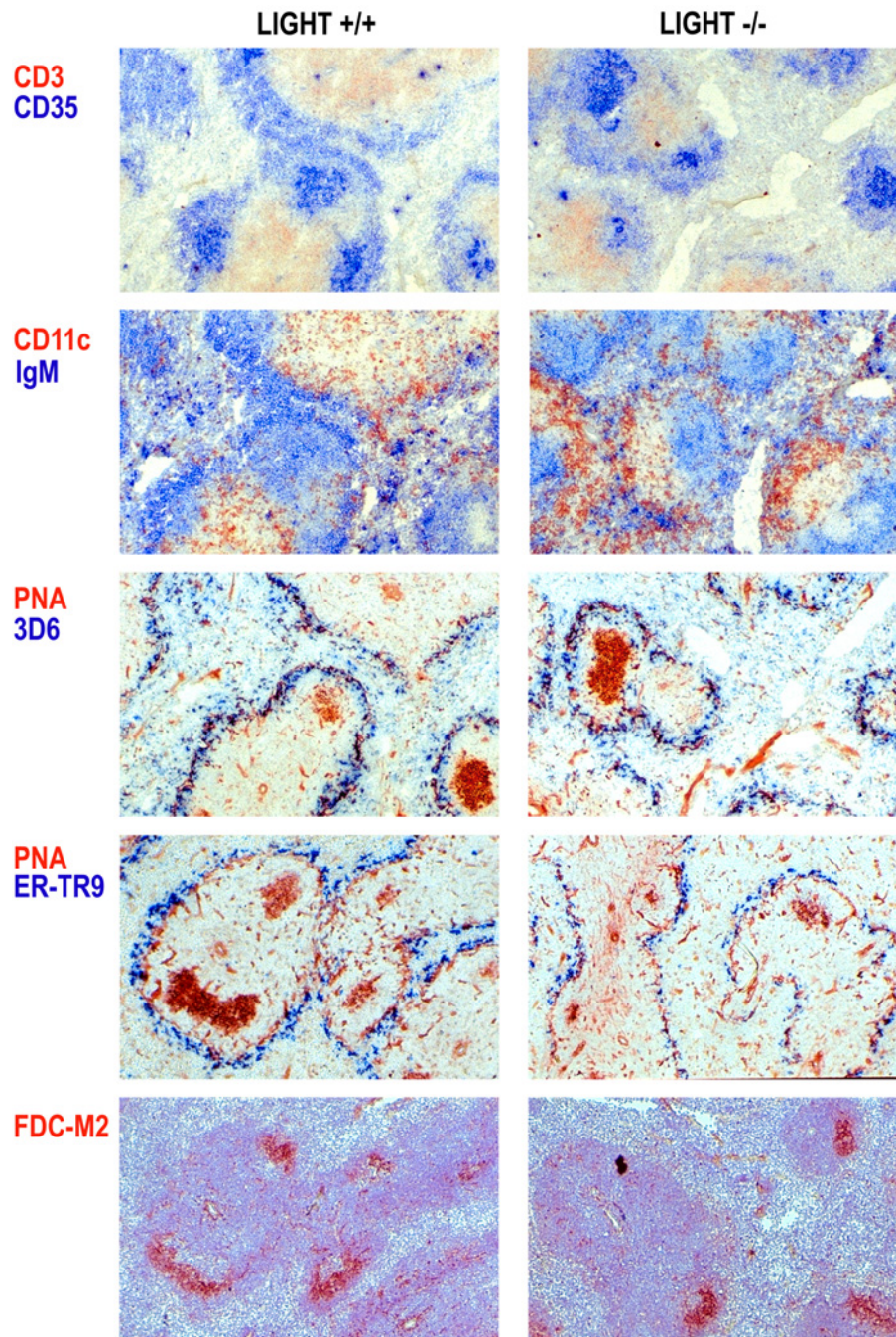


Abb. 3.15: Immunohistochemische Analyse von Milz-Gefrierschnitten aus LIGHT defizienten und WT Kontroll-Tieren. In den angegebenen Farben sind gezeigt: 1. Reihe T Zellen (CD3), FDC-Netzwerke (CD35 hoch exprimierend) und Marginalzonen B Zellen (CD35 niedrig exprimierend); 2. Reihe: Dendritische Zellen (CD11c), Marginalzonen B Zellen (IgM hoch exprimierend) und folliculäre B Zellen (IgM niedrig exprimierend); 3. Reihe: Keimzentren (PNA), Marginalsinus (PNA) und Metallophile Makrophagen (3D6); 4. Reihe: Keimzentren (PNA), Marginalsinus (PNA) und Marginalzonen Makrophagen (ER-TR9); 5. Reihe: Folliculäre Dendritische Zellen (FDC-M2), Gegenfärbung mit Haematoxylin.

Alle größeren zellulären Kompartimente der Milz, wie B Zell Follikel mit Folliculären Dendritischen Zellen (FDCs) und Keimzentren, T Zell Bereiche mit Dendritischen Zellen und die Marginalzone einschliesslich

Marginalsinus, Marginalzonen Makrophagen, metallophiler Makrophagen und Marginalzonen B Zellen sind vorhanden und intakt organisiert (Abb. 3.15 und nicht gezeigte Daten).

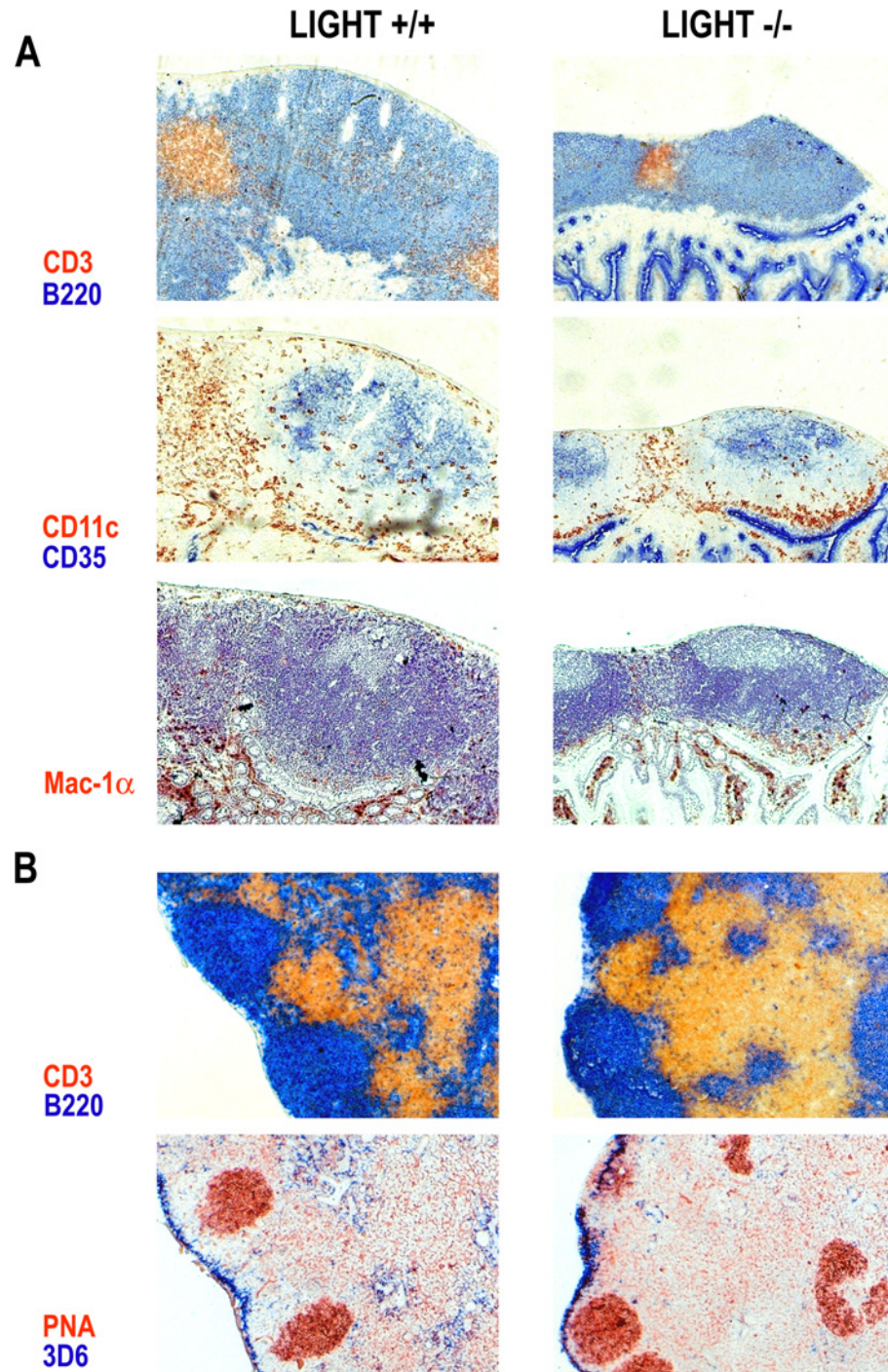


Abb. 3.16: Immunohistochemische Analyse von Peyer'schen Plaques (A) und mesenterialen Lymphknoten (B) in LIGHT defizienten Mäusen im Vergleich zu WT Kontrollen. Gezeigt sind in den angegebenen Farben: 1. Reihe (A) und (B): T Zell-Bereiche (CD3) und B Zell Follikel (B220); 2. Reihe (A): Dendritische Zellen (CD11c) und FDC-Netzwerke (CD35); 3. Reihe (A): Makrophagen und Granulozyten (Mac-1α), Gegenfärbung mit Haematoxylin; 2. Reihe (B): Keimzentren (PNA) und subkapsuläre Sinusmakrophagen (3D6).

Auch Peyer'sche Plaques (Abb. 3.16 A) und mesenteriale Lymphknoten (Abb. 3.16 B) zeigen in der immunohistochemischen Analyse in Hinblick auf T/B Zell Segregation und Keimzentrenausbildung oder Anordnung und Anzahl von Makrophagen und Follikulären Dendritischen Zellen ein unauffälliges Bild in LIGHT defizienten Tieren.

Zudem fanden sich keinerlei lymphozytäre Infiltrate in den perivaskulären Bereichen von Lunge oder Leber in LIGHT^{-/-} Mäusen (Daten nicht gezeigt), wie sie für LTβ^{-/-}, LTα^{-/-} oder LTβ Rezeptor-defiziente Mäuse beschrieben sind (Alimzhanov et al., 1997; Banks et al., 1995; Futterer et al., 1998; Koni et al., 1997).

T Zell abhängige Antikörperantworten in LIGHT defizienten Mäusen

Zur Verifikation der funktionellen Integrität der sekundären lymphatischen Organe und einer intakten Keimzentrenreaktion wurde die Bildung von hochaffinen Antikörpern als Antwort auf eine T Zell-abhängige Ag-Immunisierung überprüft (Abb. 3.17). LIGHT^{-/-} Tiere und WT Kontrollen wurden i.p. mit 5 µg NP₁₉-CG an Alum adsorbiert injiziert und 10 Tage später wurde Blut aus der Schwanzvene abgenommen. Die Titer an niedrig affinem anti-NP IgM und hoch affinen anti-NP IgG Subklassen wurden über die Bindung an dicht (NP₁₂-BSA) bzw. spärlich (NP₅-BSA) haptenisiertes Rinderserum Albumin (BSA) bestimmt. NP-spezifische primäre IgM und sekundäre IgG AK Titer für alle Subklassen waren in LIGHT^{-/-} und LIGHT^{+/+} Mäusen vergleichbar, was einen funktionierenden Klassen Wechsel und eine intakte Affinitäts Maturierung anzeigt.

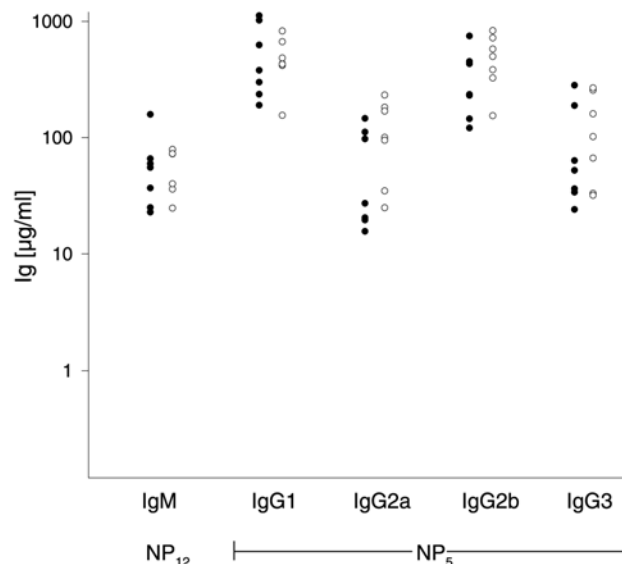


Abb. 3.17: Anti-NP Antikörper Antwort nach Immunisierung mit NP₁₉-CG. LIGHT^{-/-} (offene Kreise) und WT Kontrolltiere (ausgefüllte Kreise) wurden i.p. mit 5 µg NP₁₉-CG adsorbiert an Alum immunisiert. Anti-NP Titer im Serum wurden an Tag 10 nach Immunisierung mittels ELISA für NP-BSA bestimmt. Absolute Werte wurden anhand definierter Mengen von IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b, und IgG3 anti-NP AK-Standards definiert. Jeder Datenpunkt repräsentiert ein Versuchstier.

Diese Daten weisen daraufhin, dass die Abwesenheit von LIGHT keinen Einfluß hat auf die Zellentwicklung oder die Organogenese und Funktion lymphatischer Gewebe in Hinblick auf die Generierung T Zell-abhängiger humoraler Immunantworten. Ausreichende Signaltransduktion über den $LT\beta$ Rezeptor wird also durch die Anwesenheit des $LT\alpha_1\beta_2$ Heterotrimeres gewährleistet.

3.4.2 Sekundäre lymphatische Organe in LIGHT/ $LT\beta$ doppelt defizienten Mäusen

Mäuse mit einer Defizienz für LIGHT oder $LT\beta$ wurden verpaart, um die lymphatische Organogenese in Abwesenheit beider bekannter Liganden für den $LT\beta$ Rezeptor analysieren zu können. Sowohl der genomische Locus für LIGHT als auch der $LT\beta$ - $TNF\alpha$ - $LT\alpha$ Locus befinden sich in der Maus auf Chromosom 17 (s. 3.2.2 und (Misawa et al., 2000)). Der Abstand von ca. 10 cM zwischen den beiden Loci erlaubt jedoch die Zucht von LIGHT/ $LT\beta$ doppelt defizienten Mäusen.

Weder in $LIGHT^{+/-} LT\beta^{\Delta\Delta}$ noch in $LIGHT^{-/-} LT\beta^{\Delta\Delta}$ Mäusen konnten Peyer'schen Plaques, brachiale, axilläre, inguinale, popliteale, paraaortische oder parapankreatische Lymphknoten entdeckt werden (Daten nicht gezeigt). Allerdings ergab sich im Vergleich zu $LT\beta^{\Delta\Delta}$ (Alimzhanov et al., 1997), $LT\beta^{-/-}$ (Koni et al., 1997) oder $LIGHT^{+/-} LT\beta^{\Delta\Delta}$ Mäusen eine deutliche Reduktion im Auftreten von mesenterialen Lymphknoten in $LIGHT^{-/-} LT\beta^{\Delta\Delta}$ Tieren (Abb. 3.18). Nach eingehender mikroskopischer Analyse wurden in allen untersuchten $LIGHT^{+/-} LT\beta^{\Delta\Delta}$ Mäusen mesenteriale Lymphknoten gefunden, dagegen waren nur in vier von 16 $LIGHT^{-/-} LT\beta^{\Delta\Delta}$ Mäusen mesenteriale Lymphknoten vorhanden.

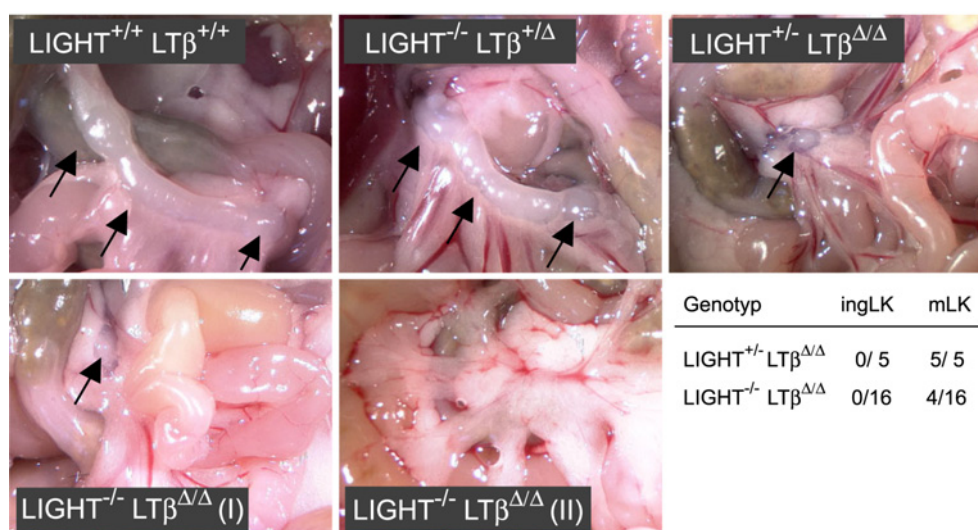


Abb. 3.18: Analyse des Mesenteriums von $LIGHT^{+/+} LT\beta^{+/+}$, $LIGHT^{-/-} LT\beta^{+/\Delta}$, $LIGHT^{+/-} LT\beta^{\Delta\Delta}$ und $LIGHT^{-/-} LT\beta^{\Delta\Delta}$ Mäusen. Nach Dissektion der Abdominalwand wurde der Bereich des mesenterialen Ursprungs präpariert. Mesenteriale Lymphknoten sind durch Pfeile gekennzeichnet. Die Frequenz in Vorkommen von inguinalen (ing) und mesenterialen (m) Lymphknoten (LKs) in LIGHT/ $LT\beta$ doppelt und $LT\beta$ einfach defizienten Tieren ist angegeben. Fünf $LIGHT^{+/-} LT\beta^{\Delta\Delta}$ und 16 $LIGHT^{-/-} LT\beta^{\Delta\Delta}$ Mäuse wurden mikroskopisch untersucht.

Die Störung der Mikroarchitektur der Milz von $LIGHT^{-/-} LT\beta^{\Delta\Delta}$ und $LIGHT^{+/-} LT\beta^{\Delta\Delta}$ Mäusen ist vergleichbar der Situation, wie sie für $LT\beta^{\Delta\Delta}$ (Alimzhanov et al., 1997) und $LT\beta^{-/-}$ (Koni et al., 1997)

Mäuse beschrieben ist. Sie ist jedoch nicht so stark zerstört wie in der $LT\beta$ Rezeptor defizienten Maus (Futterer et al., 1998). In der Milz von $LIGHT/LT\beta$ doppelt und $LT\beta$ einfach defizienten Tieren akkumulieren die T Zellen um die Zentralarteriole und sind ihrerseits von B Zellen wie von einem äußeren Wall umgeben (Abb. 3.19). Dieses Bild zeigt sich unabhängig davon, ob mesenteriale Lymphknoten vorhanden sind oder nicht. Im Gegensatz hierzu sind T und B Zellen in der $LT\beta$ Rezeptor defizienten Maus völlig durchmischt und nicht in voneinander abtrennbaren Arealen auszumachen (Futterer et al., 1998). In Milz und Lymphknoten von $LIGHT^{-/-} LT\beta^{+/Δ}$ Mäusen fanden sich keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu $LIGHT^{+/+} LT\beta^{+/+}$ Mäusen in morphologischen und histologischen Analysen.

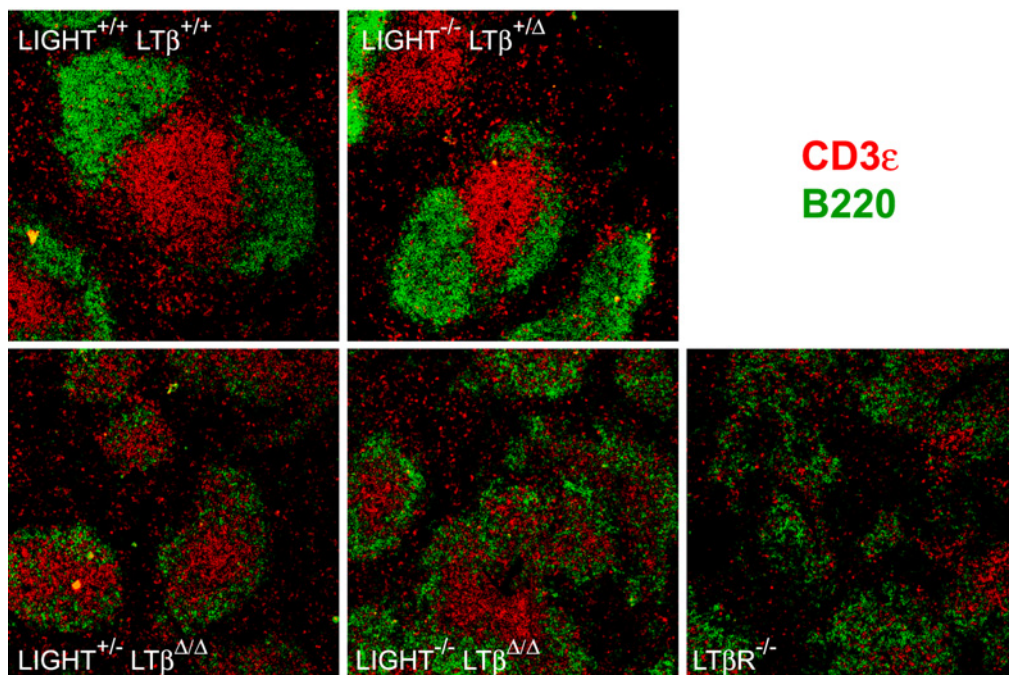


Abb. 3.19: Konfokale Lasermikroskopische Analyse der Milz-Mikroarchitektur in $LIGHT/LT\beta$ doppelt und $LT\beta$ Rezeptor defizienten Tieren. Milz-Gefrierschnitte des angegebenen Genotyps wurden mit fluoreszenzmarkierten anti-CD3 AKs (rot) und anti-B220 AK (grün) angefärbt und so die T bzw. B Zellen dargestellt.

Hieraus ist zu folgern, dass, obwohl $LIGHT$ mit $LT\beta$ in der Genese der mesenterialen Lymphknoten kooperiert, $LT\alpha_3$ oder ein noch nicht identifizierter Ligand für den $LT\beta$ Rezeptor verantwortlich ist für die relativ konservierte T/B Zell Segregation in der Milz und für die inkomplette Abwesenheit der mesenterialen Lymphknoten in $LIGHT/LT\beta$ doppelt defizienten Tieren.

3.4.3 Proliferation von $LIGHT$ defizienten T Zellen *in vitro*

Als nächstes wurden proliferative T Zell Antworten in Abwesenheit von $LIGHT$ *in vitro* untersucht. Studien mit exogen zugegebenem oder überexprimiertem $LIGHT$ oder mit Rezeptor Fusions-Proteinen, die die $LIGHT$ Funktion blockieren, ergaben Hinweise für eine kostimulatorische Funktion von $LIGHT$ bei der, vermutlich HVEM vermittelten, T Zell Proliferation (Tamada et al., 2000b; Wang et al., 2001b;

Tamada et al., 2000a). Wie aus Abb. 3.20 A ersichtlich, zeigen Splenozyten aus LIGHT defizienten Mäusen eine reduzierte $[^3\text{H}]$ -Thymidininkorporation induziert durch titrierte Mengen an löslichem anti-CD3 mAK im Vergleich zu heterozygoten oder WT Kontrollen. Im Gegensatz hierzu sind die Antworten auf ConA in LIGHT^{-/-} und WT Mäusen vergleichbar (Abb. 3.20 B). Dies unterstreicht die Bedeutung von LIGHT als kostimulatorisches Molekül in der TZR vermittelten T Zell Antwort, wogegen seine Anwesenheit nicht notwendig ist, um optimale Proliferation in einer Lektin-induzierten T Zell Aktivierung zu erreichen.

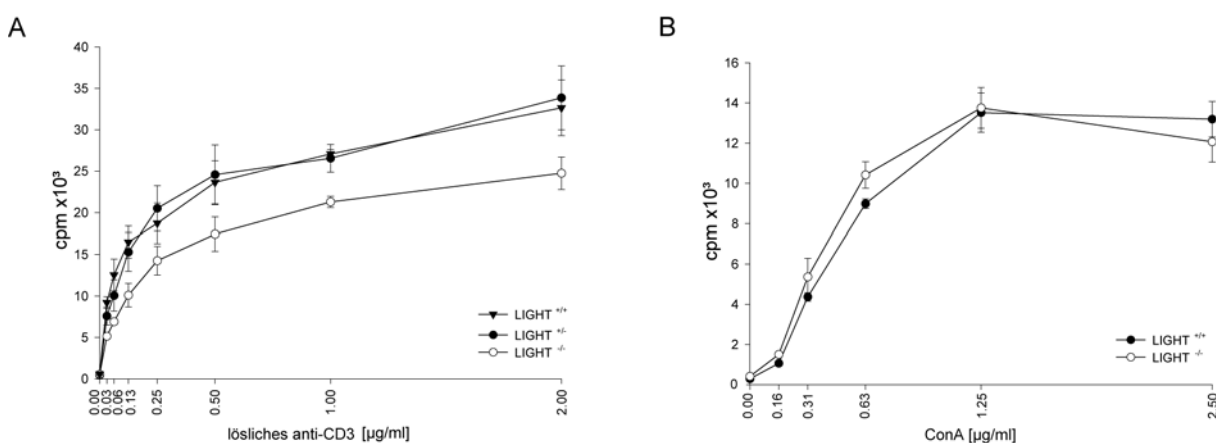


Abb. 3.20: $[^3\text{H}]$ -Thymidineinbau von T Zellen in Abwesenheit von LIGHT.

(A) T Zell Proliferation nach TZR-vermittelter Stimulation in LIGHT defizienten Mäusen. Splenozyten aus LIGHT^{-/-}, LIGHT^{+/-} und WT Kontroll Mäusen wurden 72 h mit den angegebenen Dosen an löslichem anti-CD3 mAK kultiviert. (B) ConA induzierte LIGHT^{-/-} T Zell Proliferation. Splenozyten aus LIGHT^{-/-} und WT Kontroll Mäusen wurden mit titrierten Mengen an ConA für 2 Tage inkubiert.

Die Zellen wurden mit $1\mu\text{Ci}$ für die letzten 6 – 9 h (A) oder die letzten 4 h (B) der Kultur gepulst. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus vier unabhängigen Experimenten.

Mittels des membranpermeablen Zellfluoreszenzfarbstoffs Carboxyfluoreszeindiacetat Siccinimidylester (CFSE) wurde der Einfluß der LIGHT-Abwesenheit auf die Zellzyklusaktivität nach Stimulation mit löslichem anti-CD3 mAK gemessen. Bei der Zelldivision wird der CFSE-Farbstoff gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt, wodurch bis zu acht Zellteilungen in der Durchflußzytometrie sichtbar gemacht werden können (2.10.2). Aus Abb. 3.21 A ist zu erkennen, dass sowohl der Zeitpunkt des Eintritts in den Zellzyklus, als auch die Zellteilungsaktivität von LIGHT^{+/-} und LIGHT^{-/-} CD4⁺ oder CD8⁺ T Zellen keinen Unterschied ergab. Anteilsmäßig hatten nach 72 h gleich viele CD4⁺ bis zu vier Zellteilungen durchlaufen. Auch innerhalb der CD8⁺ T Lymphozyten, die intrinsisch eine höhere Teilungsgeschwindigkeit aufweisen und sich bereits bis zu fünfmal geteilt hatten, ergab sich durch das Fehlen von LIGHT kein signifikanter Unterschied (Abb. 3.21 B). Daraus ist zu schliessen, dass LIGHT keinen Einfluß auf den Zellteilungsprozeß hat. Vielmehr erscheint es wahrscheinlich, dass die Reduktion in der $[^3\text{H}]$ -Thymidininkorporation durch einen Defekt im Überleben der T Zellen aus LIGHT^{-/-} Mäusen zu erklären ist.

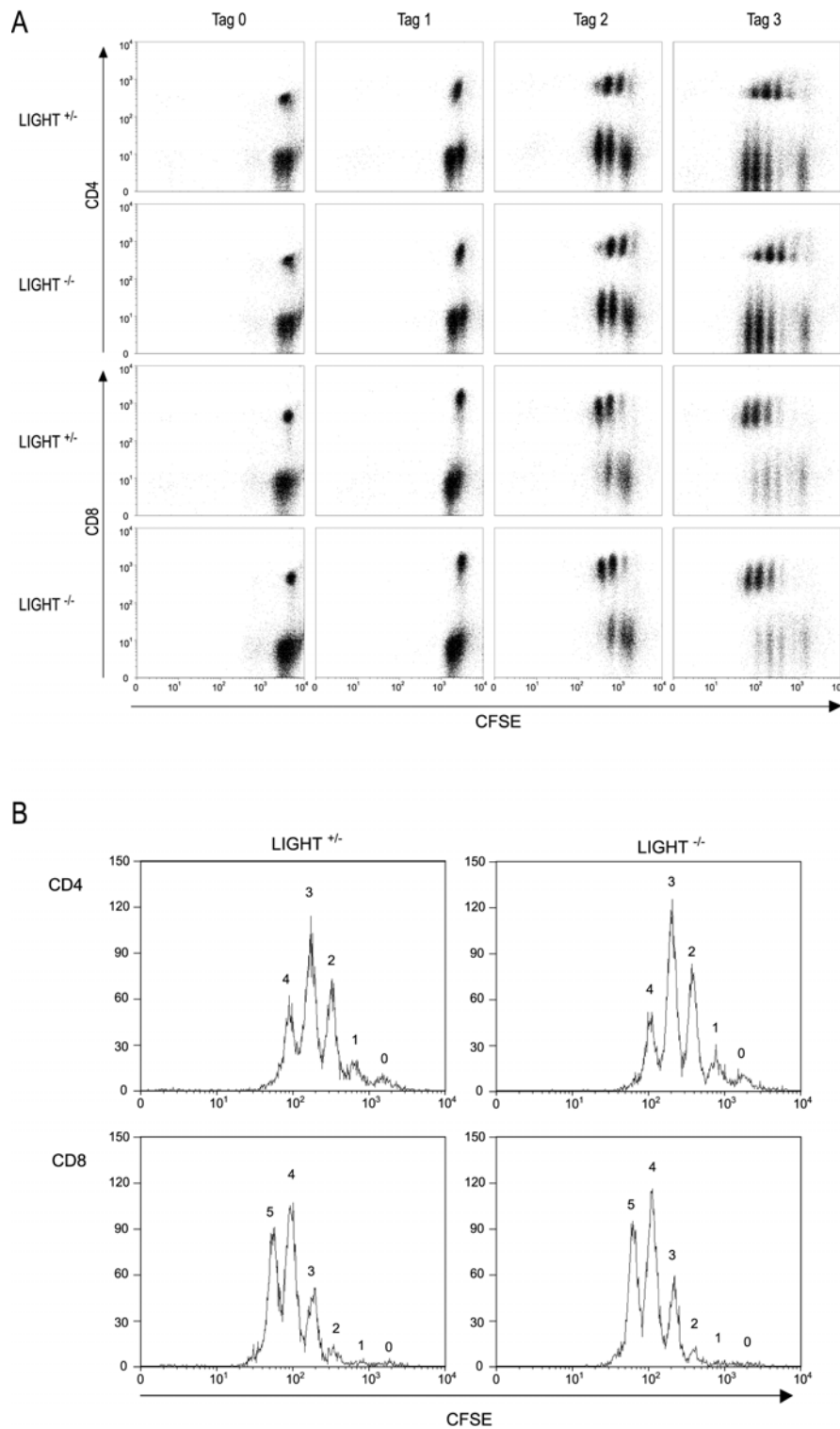


Abb. 3.21: Zellteilungsaktivität von LIGHT defizienten T Lymphozyten. Splenozyten von LIGHT^{+/+} und LIGHT^{-/-} Mäusen wurden mit CFSE markiert und mit 2 µg/ml löslichem anti-CD3 mAK inkubiert.

(A) Kinetik des Eintritts der Zellen in den Zellzyklus. Die Splenozyten wurden zum angegebenen Zeitpunkt geerntet und im FACS nach CD4- bzw. CD8-Expression und CFSE Fluoreszenzintensität analysiert.

(B) Vergleich der Zellteilungsaktivität von CD4⁺ und CD8⁺ T Zellen an Tag 3. Die Splenozyten wurden an Tag 3 der Stimulation geerntet und analog zu (A) FACS-analysiert. Einbezogen wurden hier jeweils identische Zahlen an CD4⁺ bzw. CD8⁺ T Zellen. Die Anzahl der jeweils durchlaufenen Zellteilungen ist in den Histogrammen angegeben.

3.4.4 VSV Infektion in LIGHT defizienten Mäusen

Um den Einfluß der Abwesenheit von LIGHT auf die virale Infektionsabwehr zu bemessen, wurden LIGHT^{-/-} Mäuse und WT Kontrollen mit 2×10^6 PFU Vesikulärem Stomatitis Virus (VSV) inokuliert. Nach Infektion mit VSV generierten LIGHT^{-/-} und Kontrolltiere vergleichbare neutralisierende T Zell unabhängige IgM Antworten an Tag 4 nach Infektion, gefolgt von einem T Zell abhängigen Umschalten auf die IgG Subklassen zwischen Tag 6 und 8 nach Infektion (Lefrancois, 1984; Leist et al., 1987) (Abb. 3.22 A). Ebenso zeigte die *ex vivo* CTL Aktivität, gemessen an Splenozyten an Tag 6 nach Infektion an VSV infizierten Zielzellen, keine signifikanten Unterschiede zwischen LIGHT^{-/-} und LIGHT^{+/+} Mäusen (Abb. 3.22 B). Ähnliche Ergebnisse wurden erzielt, wenn Mäuse mit einer niedrigeren Dosis von 2×10^4 PFU VSV infiziert wurden (Daten nicht gezeigt). LIGHT spielt daher keine essentielle Rolle bei der Induktion einer protektiven anti-VSV Immantwort.

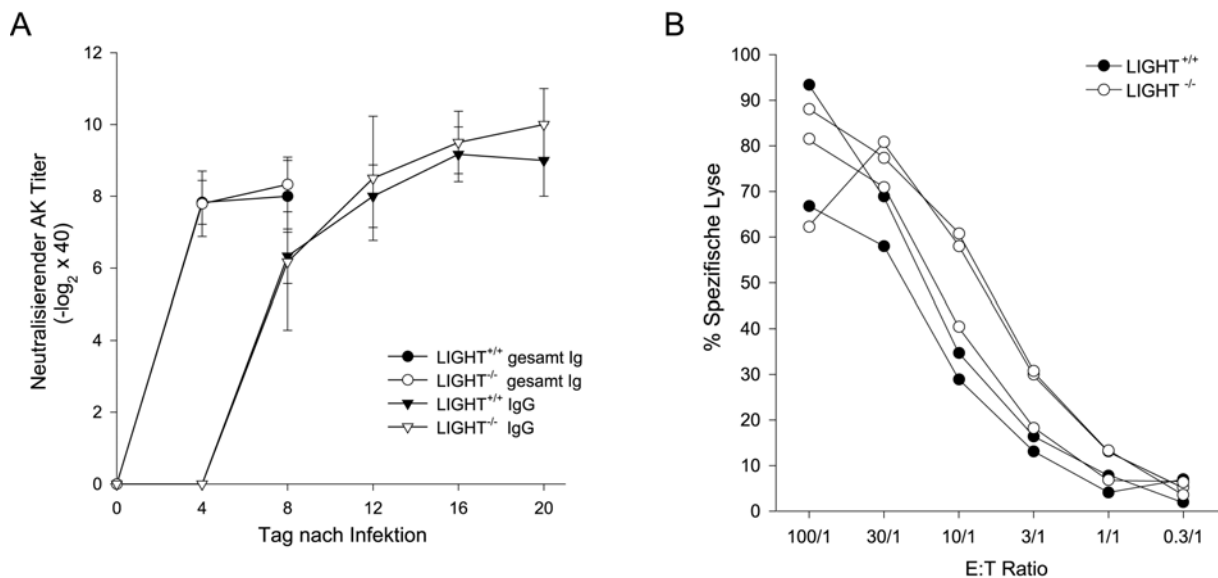


Abb. 3.22: Humorale und zelluläre Immunantworten von LIGHT^{-/-} Mäusen auf eine VSV Infektion.

(A) Neutralisierende VSV spezifische Ig Antworten. Experimentalgruppen von jeweils drei LIGHT^{-/-} (offene Symbole) und WT (ausgefüllte Symbole) Mäusen wurden mit 2×10^6 PFU VSV i.v. inokuliert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde Blut entnommen. Nach Abtrennung der Seren und 40-facher Vorverdünnung wurden Gesamt-Ig (Kreise) und IgG (Dreiecke) Antworten analysiert.

(B) CTL Aktivität nach VSV Infektion. Splenozyten aus LIGHT^{+/+} (ausgefüllte Symbole, 2 Mäuse) und LIGHT^{-/-} (offene Symbole, 3 Mäuse) Tieren, entnommen 6 Tage nach Infektion, wurden mit ⁵¹Cr-markierten VSV infizierten Zielzellen kokultiviert. Kontrollexperimente mit nichtinfizierten Tieren oder nichtinfizierten Zielzellen ergaben keine signifikante spezifische Lyse (Daten nicht gezeigt).

3.4.5 Listerieninfektion in LIGHT defizienten Mäusen

Die Rolle von LIGHT bei der Abwehr eines intrazellulären bakteriellen Pathogens wurde am Beispiel der experimentellen Listeriose analysiert. LIGHT defiziente und WT Kontroll-Tiere mit einheitlichem Körpergewicht wurden mit titrierten Dosen von *L. monocytogenes* i.p. infiziert, um ihre Suszeptibilität auf dieses gram-positive, fakultativ intrazelluläre Pathogen zu definieren (Abb. 3.23 A). Keines der

Versuchstiere überlebte die Inokulation mit 350 000 CFU *L. monocytogenes*, was einer 10-fachen LD₅₀ entspricht, länger als 5,5 Tage. Die Infektion mit 1 x LD₅₀ verlief bei fünf von sechs WT und bei zwei von fünf LIGHT defizienten Mäusen tödlich. Dies stellt bei dieser Gruppengröße keinen signifikanten Unterschied in der Sterblichkeit dar. Zusammen mit dem Befund, dass alle LIGHT^{-/-} Tiere eine Infektion mit 0,1 x LD₅₀ (3 500 CFU *L. monocytogenes*) überlebten, läßt sich für LIGHT defiziente Mäuse keine signifikant erhöhte Suszeptibilität für eine Infektion mit *L. monocytogenes* erkennen. Um eine genauere Aussage über die Fähigkeit von LIGHT^{-/-} Mäusen, den Organismus von Listerien zu befreien, treffen zu können, wurde die Anzahl von lebenden Bakterien anhand der CFU Zahl in Leber und Milz bestimmt (Abb. 3.23 B und nicht gezeigte Daten). Dieser Assay wurde mit LIGHT defizienten und WT Tieren an Tag zwölf nach Infektion mit 0,1 x LD₅₀ durchgeführt. Die Ausplattierung titrierter Homogenate der Milz ergab in beiden Experimentalgruppen kein Wachstum. Der für dieses Organ im Verlauf einer Listerieninfektion beschriebene Pathogenbefall konnte also bereits beseitigt werden. Dagegen wurden in der Leber von allen LIGHT^{-/-} Mäusen, aber nur von 50% der WT Kontrolltiere CFU Zahlen im Bereich von 10³ bis 10⁶ Listerien bestimmt. Dass drei von sechs WT Mäusen aber keine LIGHT defiziente Maus an Tag zwölf frei von Listerien waren, kann als Hinweis gewertet werden, dass LIGHT eine Rolle in der Listerienabwehr am Punkt der Übernahme durch das adaptive Immunsystem spielt (Bancroft et al., 1986; Bancroft et al., 1987; Unanue, 1997).

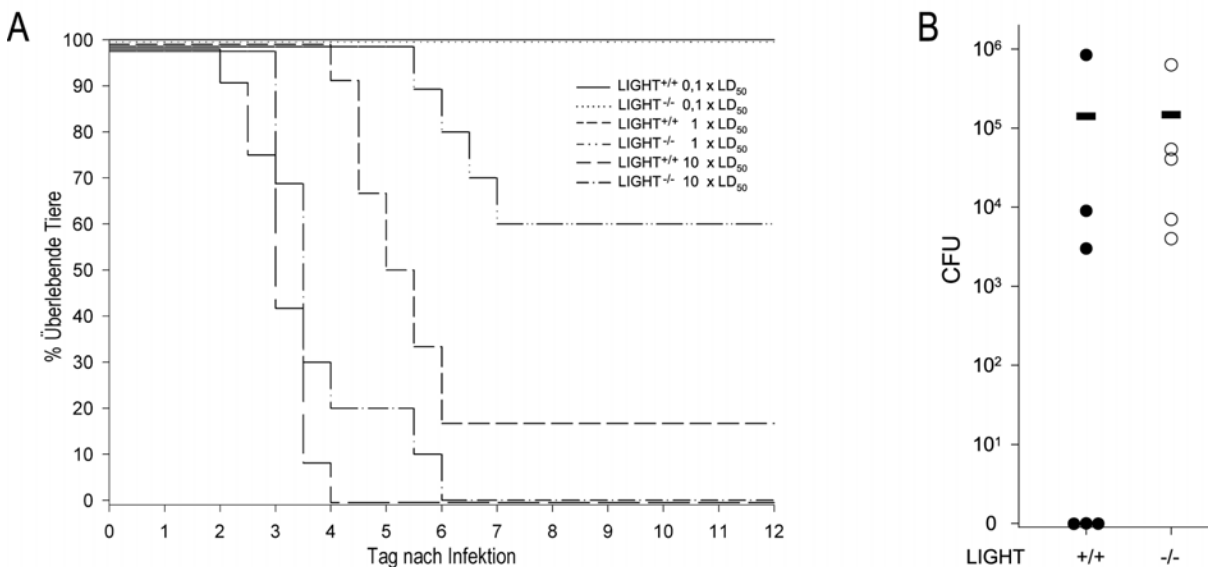


Abb. 3.23: Überlebenskinetik (A) und Bakterienzahlen (B) nach *L. monocytogenes* Infektion.

(A) Überlebenskinetik von LIGHT^{-/-} und WT Mäusen. Die Versuchstiere (5 LIGHT^{-/-} Versuchstiere pro Verdünnungsstufe, 6 LIGHT^{+/+} Versuchstiere pro Verdünnungsstufe) wurden i.p. mit 0,1 x LD₅₀ (3500 Listerien), 1 x LD₅₀ (35 000 Listerien) und 10 x LD₅₀ (350 000 Listerien) an Tag 0 infiziert und zweimal täglich auf ihren Gesundheitszustand überprüft. Mäuse, die bis zu Tag 12 überlebt hatten, zeigten keine Anzeichen von Krankheit.

(B) Bakterienzahlen in der Leber nach *L. monocytogenes* Infektion. Die Versuchstiere (jedes Symbol repräsentiert eine Maus) wurden i.p. mit 0,1 x LD₅₀ *L. monocytogenes* infiziert. Die Bakterienzahl in der Leber wurde an Tag 12 nach Infektion definiert durch Ausplattieren von homogenisiertem Gewebe in zehnfach Verdünnungsstufen auf Columbia Blut-Agar Platten.

3.4.6 Der Einfluss von LIGHT in der Abstossung von Hauttransplantaten

Nachdem deutlich reduzierte allogene Immunantworten von LIGHT defizienten Milzzellen *in vitro* beobachtet worden waren, wurde die Rolle von LIGHT *in vivo* in allogenen und H-Y disparaten Hauttransplantationsmodellen untersucht. Wie bereits beschrieben, werden allogene Transplantate von CD28 defizienten Mäusen uneingeschränkt abgestossen (Kawai et al., 1996; Maier et al., 2001). Um die Bedeutung von LIGHT als alternatives kostimulatorisches Molekül in dieser Situation abschätzen zu können, wurden LIGHT^{+/-} CD28^{+/-}, LIGHT^{-/-} CD28^{+/-}, LIGHT^{+/-} CD28^{-/-} und LIGHT^{-/-} CD28^{-/-} Mäuse mit allogener Spenderhaut von LIGHT^{-/-} (H-2^d) Tieren transplantiert (Abb. 3.24 A). Die Spendertiere waren LIGHT defizient, wodurch ein möglicher Einfluß von LIGHT, das über das Transplantat in das System gebracht werden könnte, ausgeschlossen werden kann. Während bei LIGHT^{-/-} und CD28^{-/-} Mäusen keine signifikanten Unterschiede in der akuten Transplantatabstossung im Vergleich zu WT Tieren ersichtlich waren, zeigten LIGHT^{-/-} CD28^{-/-} Mäuse ein Transplantatüberleben von bis zu 19 Tagen, sechs Tage länger als einfach defiziente oder WT Tiere. Ähnliche Ergebnisse waren bei der Kreuzung von CD28^{-/-} Mäusen in einen 4-1BBL defizienten Mausstamm erzielt worden (DeBenedette et al., 1999). Dies beweist, dass LIGHT zusammen mit CD28 eine wichtige Rolle in der allogenen Transplantatabstossung spielt.

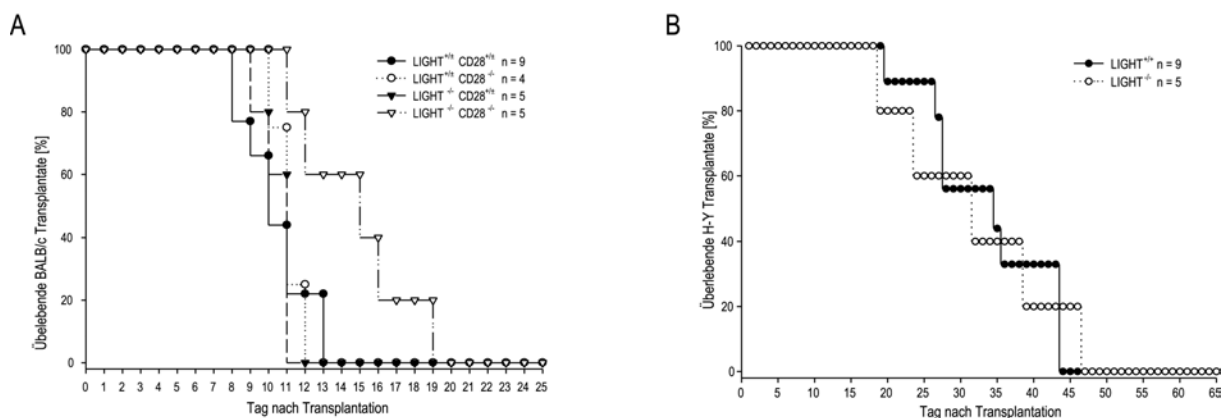


Abb. 3.24: Hauttransplantat Abstossung in LIGHT^{-/-} und LIGHT^{-/-} CD28^{-/-} Mäusen.

(A) Gruppen von 4 bis 9 Mäusen, die mindestens vierfach auf den C57BL/6 kongenen Hintergrund rückgekreuzt waren, wurden mit Hauttransplantaten von voll allogenen LIGHT^{-/-} (H-2^d) Mäusen versehen.

(B) Weibliche WT (n = 9) oder LIGHT^{-/-} (n = 5) Mäuse erhielten Hauttransplantate von männlichen LIGHT^{-/-} Mäusen des selben genetischen Hintergrunds.

Die Transplantate wurden täglich kontrolliert und als abgestossen gewertet, wenn keine lebende Spenderhaut mehr zu erkennen war.

In einem zweiten experimentellen Ansatz wurde die Fähigkeit von LIGHT^{-/-} Mäusen untersucht, Hauttransplantate mit Disparität lediglich in einem Nebenhistokompatibilitäts Locus abzustossen. Zu diesem Zweck wurden Hauttransplantate männlicher LIGHT^{-/-} Mäuse auf kongene WT oder LIGHT^{-/-} Weibchen aufgebracht, die sich nur im geschlechtsspezifischen H-Y Locus von den Spendertieren unterschieden. Aus Abb. 3.24 B ist ersichtlich, dass auch in dieser Situation einer schwachen Disparität in einem Nebenhistokompatibilitätslokus bei identischem MHC in LIGHT defizienten Tieren eine intakte

Transplantatabstossung erhalten ist. In gleicher Weise wie WT Kontrolltiere stossen sie die Spenderhaut in einem Zeitraum von 20 bis 45 Tagen komplett ab, was mit den in der Literatur beschriebenen Experimenten übereinstimmt (Bailey and Hoste, 1971; Bailey, 1971). Dies verdeutlicht erneut, dass die im Immunsystem existierende Redundanz das alleinige Fehlen eines kostimulatorischen Moleküls, wie es LIGHT darstellt, in der Hauttransplantatabstossung kompensieren kann.

3.4.7 Reifung von LIGHT defizienten Dendritischen Zellen

Ein möglicher Grund für die schlechtere Aktivierung der LIGHT^{-/-} Effektorzellen in der allogenen MLR könnte in einer Funktionsdefizienz der Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) in der Kultur liegen. Für den Menschen ist bereits beschrieben, dass LIGHT in Kooperation mit CD154 (CD40-L) an der Reifung von Dendritischen Zellen, die auch als professionelle APCs bezeichnet werden, beteiligt ist (Morel et al., 2001). Um die Reifung und Funktion von DCs in LIGHT defizienten Mäusen zu untersuchen, wurden DCs *in vitro* aus Knochenmark generiert (siehe 2.8.4) und mittels LPS-Zugabe stimuliert. Der Maturationsgrad der DCs wurde anhand der Hochregulation kostimulatorischer Oberflächenmoleküle überprüft.

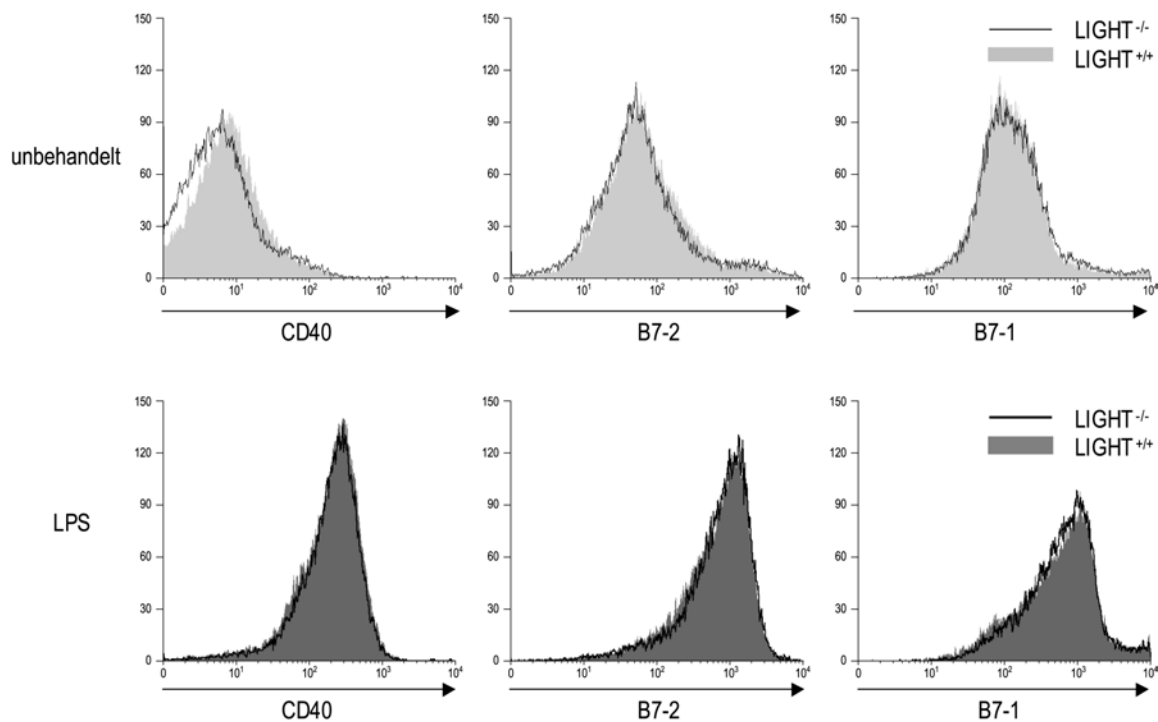


Abb. 3.25: Aktivierungsmarker auf LIGHT^{-/-} Knochenmarks-gereiften Dendritischen Zellen. Die aus Knochenmark aus LIGHT^{+/+} oder LIGHT^{-/-} Mäusen *in vitro* generierten DCs wurden für 12 h mit 100 ng/ml LPS stimuliert oder unbehandelt belassen. Die FACS Analyse der Expression von Oberflächenmolekülen erfolgte mit anti-CD40, anti-B7-1 und anti-B7-2 Antikörpern und wurde auf CD11c⁺ Zellen beschränkt.

Wie aus Abb. 3.25 zu ersehen, regulieren DCs aus WT und LIGHT defizienten Tieren in vergleichbarem Maße CD40, B7-1 und B7-2 hoch. Auch die basalen Expressionsniveaus der drei Reifungsmarker ist in

beiden DC Populationen fast identisch. Ebenso zeigte sich, dass LIGHT^{-/-} DCs in gleicher Weise wie WT DCs in der Lage sind, als Antwort auf einen LPS Stimulus IL-12 zu exprimieren (Abb. 3.26).

Es lies sich also unter den gewählten Bedingungen kein intrinsischer Maturierungsdefekt in LIGHT defizienten DCs in Hinblick auf Expression kostimulatorischer Oberflächenmoleküle und Zytokinproduktion finden.

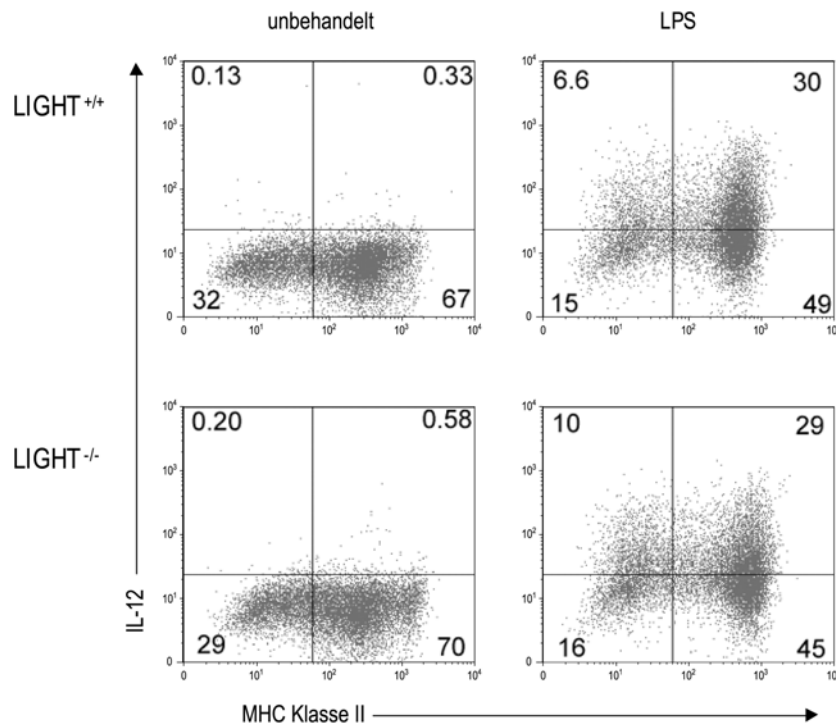


Abb. 3.26: Intrazelluläre IL-12 Produktion in Knochenmarks-gereiften Dendritischen Zellen. Wie in Abb. 3.25 wurden Knochenmarks-gereifte DCs LPS stimuliert. Hier wurde die IL-12 Produktion mittels intrazellulärer FACS Färbung ermittelt. Die FACS Analyse betrifft nur CD11c⁺ Zellen und wurde um MHC Klasse II als zusätzlichen Oberflächenmarker erweitert. In den einzelnen Quadranten ist die entsprechende Zellverteilung in Prozent angegeben.

3.4.8 Die allogene MLR in Abwesenheit von LIGHT

Zur weiteren Analyse der Mechanismen, die zu der beobachteten, verzögerten Transplantatabstossung führen, und um zu überprüfen, ob LIGHT für die Generierung von effizienten T Zell Effektor Funktionen *in vitro* notwendig ist, wurden allogene "Mixed Lymphocyte Reactions" (MLRs) durchgeführt. Splenozyten des Haplotyps H-2^b wurden mit radioaktiv bestrahlten allogenen H-2^d Milzzellen für fünf Tage stimuliert. Um einen möglichen Einfluß von löslichem LIGHT auszuschließen, das von der Zelloberfläche durch Matrixmetalloproteinasen (Morel et al., 2000) abgetrennt werden kann, wurden MLRs bestehend aus LIGHT defizienten Effektor und Stimulator Populationen mit solchen verglichen, in denen beide Populationen entweder heterozygot oder WT für das *light* Allel waren.

CTL Aktivität von *LIGHT* defizienten Splenozyten

Die CTL Aktivität von H-2^b Effektoren gegen allogene P815 (H-2^d) Zielzellen oder syngene EL-4 (H-2^b) Kontrollzielzellen wurde an Tag 5 der MLR in einem Standard Chrom-Assay (s. 2.10.4) ausgelesen. Interessanterweise zeigten *LIGHT*^{-/-} Effektor Splenozyten eine deutliche Reduktion in der spezifischen Lyse der allogenen P815 Zielzellen im Vergleich zu Effektor Splenozyten aus MLR Kulturen, in denen *LIGHT* exprimiert wurde (Abb. 3.27). Wie erwartet wurden die syngenen Kontrollzielzellen von keiner der beiden Populationen lysiert.

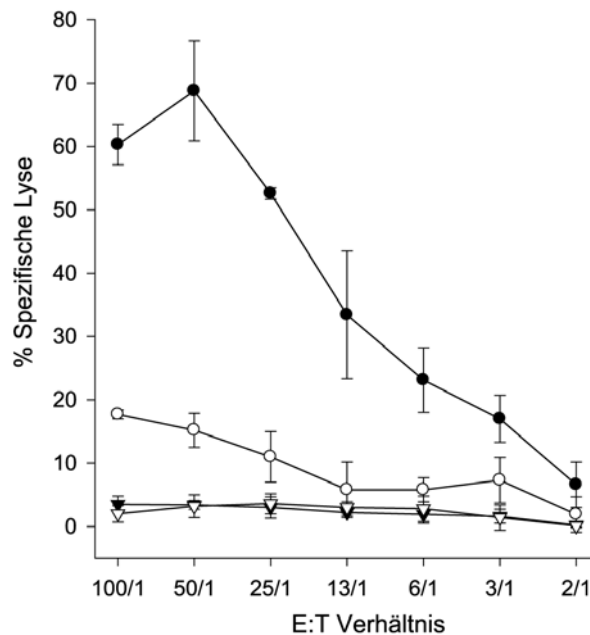


Abb. 3.27: Alloreaktive CTL Antwort von H-2^b Effektor Zellen. An Tag 5 einer allogenen MLR wurde die CTL Aktivität der *LIGHT*^{+/+} (schwarze Symbole) oder *LIGHT*^{-/-} (weiße Symbole) Effektoren des H-2^b Haplotyps an P815 (H-2^d) Zielzellen (Kreise) oder EL-4 (H-2^b) Kontroll-Ziellzellen (Dreiecke) in einem Chrom-Assay getestet. Ein repräsentatives von fünf unabhängigen Experimenten ist gezeigt.

Zytokine im MLR Kultur-Überstand in Abwesenheit von *LIGHT*

Daraufhin wurde die Zytokinproduktion *LIGHT* defizienter Splenozyten nach fünftägiger MLR-Aktivierung untersucht (Abb. 3.28). Die MLR Überstände von Kulturen mit *LIGHT* defizienten Zellen beinhalteten stark reduzierte Mengen an IFN γ und IL-2, wie auch in geringerem Maße IL-4 und IL-10 im Vergleich zu WT oder heterozygoten MLR Kulturen. Im Gegensatz dazu war die Konzentration von IL-12p40, einem Zytokin, das hauptsächlich von DCs produziert wird, in KO, WT und heterozygoten Kulturen sehr ähnlich. Dies untermauert die Daten aus Abb. 3.26, in der IL-12 in Knochenmarksgereiften DCs unabhängig von *LIGHT* intrazellulär nachgewiesen wurde.

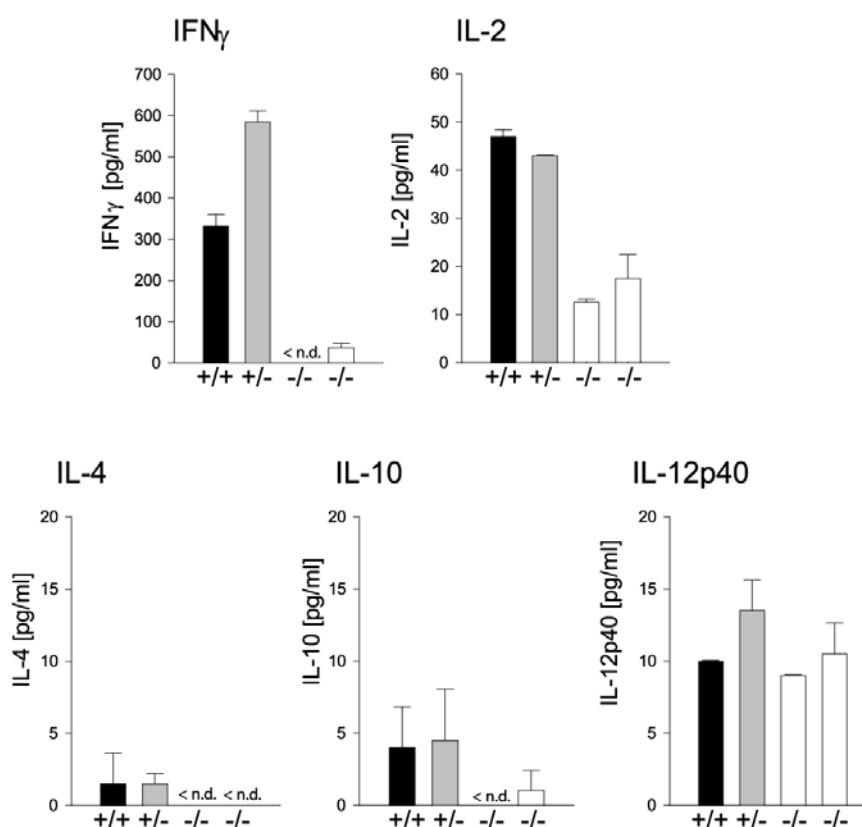


Abb. 3.28: Zytokinkonzentrationen in Abwesenheit von LIGHT in einer allogenen MLR. Zytokinmengen in MLR Kulturüberständen wurden an Tag 5 mittels ELISA bestimmt. Das Detektionslimit für IL-4 und IFN γ liegt bei 2 pg/ml, für IL-2 bei 3 pg/ml und für IL-10 bei 4 pg/ml. n.d., nicht detektierbar. Zwei repräsentative von insgesamt fünf unabhängigen Experimenten sind gezeigt.

Interessanterweise betrifft die verringerte Zytokinproduktion von LIGHT defizienten Splenozyten nicht nur die T Helfer Zell Typ 1 Antwort, wie IFN γ oder IL-2, sondern auch die typischen T Helfer Zell Typ 2 Zytokine IL-4 und IL-10.

CD4:CD8 Verhältnis von MLR-aktivierten LIGHT defizienten T Zellen

Mittels FACS-Färbung wurde das CD8:CD4 Verhältnis von MLR-aktivierten Effektor Zellen ermittelt (Abb. 3.29). Hierbei wurden nur die CD3⁺ und in "Forward-" und "Sideward-Scatter" erhöhten Zellen in die Analyse eingeschlossen, um nur die tatsächlich aktivierten T Zellen zu erfassen. An Tag 5 der MLR war das Verhältnis von aktivierten CD8⁺ zu CD4⁺ Effektor T Zellen in signifikanter Weise um 40 % in den LIGHT defizienten MLRs reduziert im Vergleich zu Kulturen mit LIGHT^{+/-} oder WT Splenozyten. Dagegen fand sich an Tag 4 der MLR dieser Unterschied als noch nicht derart ausgeprägt. Das CD8:CD4 Verhältnis naiver Splenozyten an Tag 0 war vergleichbar in WT, LIGHT^{+/-} und LIGHT^{-/-} MLRs.

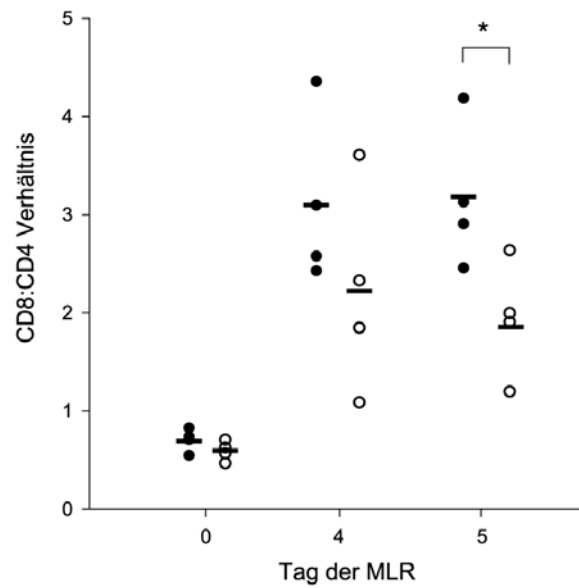


Abb. 3.29: CD8:CD4 Verhältnis aktivierter Effektor T Zellen in einer allogenen MLR. FACS Analysen wurden an allogenen MLRs an den Tagen 0, 4 und 5 durchgeführt. Gezeigt ist das Verhältnis von CD8⁺ zu CD4⁺ Zellen in MLRs bestehend aus LIGHT^{+/-} oder LIGHT^{+/+} (ausgefüllte Kreise) und LIGHT^{-/-} (offene Kreise) Splenozyten. Dabei wurden nur CD3⁺ H-2K^b Lymphozyten als naive T Zellen an Tag 0 und CD3⁺ H-2K^b Lymphozyten mit hohem "Forward-" und "Sideward-Scatter" an den Tagen 4 und 5 in die Analyse einbezogen. Jeder Kreis repräsentiert einen unabhängigen MLR-Ansatz bestehend aus individuellen H-2K^b (Effektoren) und H-2K^d (Stimulatoren) Mäusen. Die Mittelwerte der Experimentalgruppen sind durch Balken gekennzeichnet. Der Stern zeigt statistisch signifikante Unterschiede (P = 0,0025).

Diese Ergebnisse zeigen, dass LIGHT für die effiziente Aktivierung zytotoxischer T Zellen in einer allogenen MLR *in vitro* von essentieller Bedeutung ist.

4 DISKUSSION

Die biologischen Funktionen der einzelnen Mitglieder der TNF Liganden und Rezeptor Superfamilien sind hochkomplex und überspannen entwicklungsbiologische Prozesse bis hin zu angeborenen und adaptiven Immunantworten (Fu and Chaplin, 1999; Locksley et al., 2001; Watts and DeBenedette, 1999). Einblick in die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen erlangte man durch den Einsatz der Geninaktivierung in der Keimbahn von Mäusen oder der Behandlung mit Rezeptor-Fc Fusionsproteinen, antagonistischen und agonistischen Antikörpern. In dem Moment, in dem Rezeptoren von mehreren unterschiedlichen Liganden aktiviert werden können, wie es der Fall ist bei HVEM und dem $LT\beta$ Rezeptor (Crowe et al., 1994; Mauri et al., 1998), oder wenn Liganden an mehr als einen Rezeptor binden können, wie im Fall von LIGHT (Mauri et al., 1998), kann nur die Inaktivierung eines Gens in der Keimbahn von Mäusen Aufschluß gewähren über die individuellen entwicklungsbiologischen und immunologischen Aufgaben eines bestimmten Moleküls. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein LIGHT defizienter Mausstamm generiert und analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass dieses kürzlich identifizierte LT/TNF Familienmitglied eine kostimulatorische Rolle bei der Aktivierung von T Zellen spielt und in Kooperation mit $LT\beta$ an der Genese der mesenterialen Lymphknoten beteiligt ist.

4.1 LIGHT in der Organogenese des sekundären lymphatischen Systems

Sekundäre lymphatische Organe wie periphere und mesenteriale Lymphknoten, Milz und Peyer'sche Plaques sind in unveränderter Morphologie und zellulärer Mikroarchitektur in LIGHT defizienten Mäusen vorzufinden. Auch PNA⁺ Keimzentren und FDC Netzwerke finden sich vollkommen korrekt ausgebildet und plziert, was LIGHT^{-/-} Mäuse deutlich von Tieren mit einer Gendefizienz für einen der drei anderen Liganden der engeren LT/TNF Familie unterscheidet. Weder in Mäusen mit einer Defizienz in $LT\alpha$ (Matsumoto et al., 1996b), noch in $LT\beta$ (Alimzhanov et al., 1997; Koni et al., 1997) oder TNF (Korner et al., 1997; Pasparakis et al., 1996) sind nach Immunisierung voll entwickelte Keimzentren mit Netzwerken Follikulärer Dendritischer Zellen zu finden.

Die funktionelle Integrität der Milzarchitektur von LIGHT defizienten Tieren wurde mittels Immunisierung mit einer niedrigen Dosis von NP-CG analysiert. Anhand der Serumkonzentrationen von hochaffinen anti Hapten, im vorliegenden Fall anti NP IgG Antikörpern, können Immunglobulin Klassen Wechsel und Affinitätsreifung, zwei Hauptkomponenten der Keimzentrenreaktion, überprüft werden. Während TNF Rezeptor p55^{-/-}, $LT\beta$ Rezeptor^{-/-} und $LT\alpha$ ^{-/-} Mäuse nach wiederholter Injektion von hohen Dosen haptensierten Antigens fast uneingeschränkte Affinitätsreifung aufweisen, zeigt sich bei einmaliger Immunisierung mit einer niedrigen Antigen-Dosis in diesen Mäusen eine deutliche Reduktion in der Generierung hochaffiner anti Hapten Antikörper (Matsumoto et al., 1996a; Futterer et al., 1998). Dies gilt in etwas abgeschwächter Form auch für $LT\beta$ ^{-/-} Mäuse (Koni et al., 1997). LIGHT^{-/-} Mäuse dagegen generieren nach einmaliger Injektion einer niedrigen Dosis von NP-CG sowohl T Zell-unabhängige

niedrig affine IgM, als auch hochaffine T Zell-abhängige IgG Antworten aller Subklassen, die mit denen von Wildtyp Mäusen vergleichbar sind. Dies zeigt LIGHT-unabhängige intakte Affinitätsreifung und Immunglobulin Klassen Wechsel *in vivo* in Abwesenheit von LIGHT.

Man kann also hieraus schliessen, dass in Abwesenheit des LIGHT Moleküls der LT β Rezeptor noch in ausreichendem Maße eine Signaltransduktion einleiten kann, in dem er durch den noch im System vorhandenen zweiten Liganden, LT $\alpha_1\beta_2$, aktiviert wird. Eine mögliche zusätzliche Rolle einer LIGHT-HVEM Interaktion in der lymphatischen Organogenese ist dennoch nicht völlig auszuschliessen, da diese durch die in LIGHT defizienten Tieren noch intakte LT α_3 -HVEM Interaktion maskiert würde.

Als nächstes wurden die postulierten redundanten Rollen von LIGHT und dem LT $\alpha_1\beta_2$ Heterotrimer in der Ontogenese lymphatischer Organe durch Verkreuzung von LIGHT^{-/-} und LT $\beta^{\Delta/\Delta}$ Mäusen näher untersucht.

Die relativ konservierte Mikroarchitektur der Milz der LT β einfach defizienten Mäuse, die das LT $\alpha_1\beta_2$ Heterotrimer nicht ausbilden können, mit weitestgehend intakter T/B Zellsegregation ist in LIGHT/LT β doppelt defizienten Mäusen in gleichem Maße erhalten. Die steht im Gegensatz zu der weitaus deutlicher gestörten zellulären Architektur der Milz in LT β Rezeptor- und LT α -defizienten Mäuse (Banks et al., 1995; De Togni et al., 1994; Futterer et al., 1998). LIGHT scheint daher nicht an der Organisation der Milz-Mikroarchitektur beteiligt zu sein, was wiederum zu Spekulationen auf einen unbekanntem, dritten Liganden für den LT β Rezeptor führt. Die Beobachtung, dass sogar in Abwesenheit jeglicher Lymphknoten in LIGHT^{-/-} LT $\beta^{\Delta/\Delta}$ Mäusen die T/B Zell Kompartimentalisierung in der Milz relativ intakt bleibt, schliesst die frühere Hypothese aus, dass die schwerwiegende Desorganisation der Milz in LT α ^{-/-} und LT β Rezeptor^{-/-} Mäusen ein sekundärer Effekt ist, verursacht durch die gezwungenermaßen in die Milz umgeleitete Migration von Lymphozyten, die normalerweise in Lymphknoten einwandern würden. Weitere Beweise gegen eine solche Hypothese können aus dem Phänotyp anderer gendefizienter Mäuse abgeleitet werden. Mäuse mit einer Defizienz für den helix-loop-helix Transkriptionsfaktor Id2 oder für das TNF Familienmitglied OPGL besitzen beispielsweise keinerlei Lymphknoten, weisen aber eine völlig intakte Mikroarchitektur in der Milz auf (Kong et al., 1999; Yokota et al., 1999). Vielmehr muss man in Hinblick auf die T/B Zellsegregation in der Milz für eine Rolle von LT α argumentieren, unabhängig von seiner Teilnahme an der Ausbildung von LT $\alpha_1\beta_2$ Heterotrimeren und seiner Interaktion mit dem LT β Rezeptor. Die drei Mitglieder der TNF Rezeptor Familie, die LT α_3 als Homotrimer binden können, sind TNFRp55, TNFRp75 und HVEM. Da LT β /TNF doppelt defiziente Tiere schwerwiegendere Defekte in der T/B Zellsegregation aufweisen als Tiere, die defizient für nur einen der beiden Liganden sind (Kuprash et al., 1999), können der TNFRp55 und TNFRp75 nicht von einer Beteiligung an der Ausbildung der Milzarchitektur ausgeschlossen werden.

Die Studien an LIGHT^{-/-} LT $\beta^{\Delta/\Delta}$ Mäusen deckten jedoch eine kooperative Beteiligung von LIGHT und LT β an der Morphogenese der mesenterialen Lymphknoten auf. In LT β einfach defizienten Tieren sind die mesenterialen Lymphknoten erhalten. Dabei variiert allerdings die Häufigkeit, mit der mesenteriale Lymphknoten in diesen Tieren gefunden werden, in unterschiedlichen Arbeitsgruppen in einem Bereich von 100 % bis 60 % der Mäuse (Alimzhanov et al., 1997; Koni et al., 1997; Kuprash et al., 1999; Rennert et al., 2001). Die Gründe für die Unterschiede in der Häufigkeit des Auftretens der mesenterialen Lymphknoten sind unklar, könnten aber in dem uneinheitlichen genetischen Hintergrund der Mäuse

und in unterschiedlichen Tierhaltungs Bedingungen zu finden sein. Parallelen hierzu sind beispielsweise bei Mäusen mit einer Defizienz für den Chemokinrezeptor CXCR5 zu finden. Je nachdem, in welchen genetischen Hintergrund diese Tiere zurückgekreuzt waren, fand man unterschiedliche Frequenzen im Auftreten bestimmter Lymphknoten Gruppen. Befanden sich die Tiere auf einem gemischten BL/6 / 129 genetischen Hintergrund waren in allen untersuchten Tieren z.B. die poplitealen Lymphknoten abwesend. Nach sechsmaligem Rückkreuzen auf den Mausstamm 129 fand man jedoch in zehn von zehn untersuchten CXCR5^{-/-} Mäusen popliteale Lymphknoten (Ansel et al., 2000). Im Vergleich zu den veröffentlichten Daten und zu den hier verwendeten LIGHT^{+/-} LTβ^{Δ/Δ} Kontrolltieren zeigten LIGHT/LTβ doppelt defiziente Tiere eine deutliche Reduktion in der Häufigkeit des Auftretens der mesenterialen Lymphknoten. Dies zeigt, dass in Abwesenheit von LTβ LIGHT als alternativer Ligand den LTβ Rezeptor binden und damit die für die Entwicklung der mesenterialen Lymphknoten unentbehrliche Signaltransduktion über diesen Rezeptor initiieren kann (Futterer et al., 1998). Die Anwesenheit von mesenterialen Lymphknoten in 25 % der LIGHT/LTβ doppelt defizienten Tiere weist auf die Existenz eines noch unentdeckten Liganden für den LTβ Rezeptor hin oder aber auf eine schwache Bindungsaktivität des LTα₃ Homotrimeren an den LTβ Rezeptor *in vivo*, obwohl *in vitro* Daten die letztere Möglichkeit nicht unterstützen (Crowe et al., 1994). Die Rolle von HVEM in der lymphatischen Organogenese ist bis dato noch völlig ungeklärt.

Während für die Aufrechterhaltung der konstitutiven Gewebearchitektur der lymphatischen Organe LIGHT nicht essentiell ist, beeinflusst eine chronisch erhöhte Expression von LIGHT durchaus die Struktur der lymphatischen Organe und führt zur Ausbildung von Autoimmunerkrankungen (Shaikh et al., 2001; Wang et al., 2001b; Wang et al., 2001a und Y.-X. Fu persönliche Korrespondenz).

Unter Einbeziehung dieser neuen Daten läßt sich ein detaillierteres Schema für die Ontogenese der mesenterialen Lymphknoten erstellen. Anhand von histologischen Studien konnte man früh fünf Stufen der Lymphknoten Organogenese definieren (Sabin, 1902; Sabin, 1909; Bailey and Weiss, 1975; Eikelenboom et al., 1978):

Stufe 1: An Tag 10,5 der Embryonalentwicklung der Maus bilden sich lymphatische Aussackungen, die ihren Ursprung in Ausknospungen des venösen Endothels haben. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass Prox1, ein Homolog des *prospero* aus *Drosophila*, für das Ausknospen der endothelialen Zellen aus den Venen von essentieller Bedeutung ist. In Prox1^{-/-} Mäusen kommt es daher zum frühen kompletten Arrest der Entwicklung des lymphatischen Systems und zur embryonalen Letalität an Tag 14,5 – 15 der Embryonalentwicklung (Wigle and Oliver, 1999).

Stufe 2: Lymphatische Gefäße entwickeln sich als endotheliale Aussprossungen aus diesen lymphatischen Aussackungen.

Stufe 3: Durch Invagination mesenchymalen Bindegewebes in das Lumen der wachsenden lymphatischen Aussackungen bilden sich die Lymphknoten Anlagen. So ergibt sich als Netzwerk lymphatischer Kanäle ein lymphatischer Plexus, aus dem sich Lymphknoten entwickeln können. Dieses invaginierte mesenchymale Bindegewebe bildet die Anlage des Lymphknoten Parenchyms, das Retikulozyten, Fibroblasten, einige Leukozyten, Kapillaren und Gefäßschleifen enthält. Primordiale Lymphknoten bestehen daher aus vorläufigen zellulären Retikula umgeben von endothelialen Zellen der Lymphkanäle, die später den subkapsulären Sinus bilden werden. Die Blutversorgung der fötalen Lymphknoten ist

zu diesem Zeitpunkt bereits durch Gefäße gewährleistet, die durch den Stiel des invaginierten Bindegewebes laufen. Innerhalb dieser Lymphknoten Anlage bilden sich die spezialisierten Endothelzellen, die den Leukozyteneinstrom aus der Blutbahn in das daruntergelegene Lymphknoten Parenchym unterstützen.

Stufe 4: Die Zelldichte und der Leukozytengehalt in der Lymphknoten Anlage nimmt zu, und der subkapsuläre Sinus bildet sich aus. Wahrscheinlich während dieses Stadiums der Lymphknotenentwicklung kolonisieren die Mehrzahl der hämatopoetischen Vorläuferzellen das nodale Parenchym.

Stufe 5: Die Lymphknoten Anlage wächst weiter und bildet eine Kapsel. Die Zelldichte und der Leukozytengehalt nimmt weiter zu, und reife Lymphozyten wandern in den sich entwickelnden Lymphknoten ein und etablieren die spezielle zelluläre Mikroarchitektur.

Alle Lymphknoten und Peyer'sche Plaques exprimieren in der späten fötalen und frühen neonatalen Phase das mukosale Adressin MAdCAM-1, wodurch ein Einwandern von Zellen über MAdCAM-1/ $\alpha_4\beta_7$ Interaktionen gewährleistet ist. Erst 24 – 48 hrs nach der Geburt beginnt die Expression des Peripheren Lymphknoten Adressins PNAd an der luminalen Seite der hohen Endothelvenen der Lymphknoten (HEV), das es L-Selektin-positiven Zellen erlaubt, die Blutbahn zu verlassen und über die endotheliale Barriere in den Lymphknoten einzuwandern. In der adulten Maus exprimieren die HEVs der peripheren Lymphknoten ausschliesslich PNAd, die der mesenterialen Lymphknoten zusätzlich zu PNAd auch MAdCAM-1 und die HEVs der Peyer'schen Plaques ausschliesslich MAdCAM-1, was zu einem spezifischen Migrationsverhalten der Lymphozyten in Abhängigkeit ihres Integrin-Expressionsmusters führt (Kraal and Mebius, 1997; Gowans and Knight, 1964).

Neuere Studien konnten eine bestimmte Zellpopulation definieren, die entscheidend am Übergang von Stufe 3 zu Stufe 4 der Lymphknotenentwicklung beteiligt ist, wenn die ersten hämatolymphatischen Vorläuferzellen die Lymphknoten Anlage kolonisieren und dort Aggregate bilden. Diese Zellpopulation trägt den IL-7R α , LT $\alpha_1\beta_2$, $\alpha_4\beta_7$ und CD4 ist aber negativ für CD3 und andere Zelloberflächenmarker für B, T, NK oder Dendritische Zellen. Es wurde gezeigt, dass diese Zellpopulation initial in die fötalen Lymphknoten aber auch Peyer'sche Plaque Anlagen in MAdCAM-1/ $\alpha_4\beta_7$ vermittelter Weise einwandert (Adachi et al., 1998; Kelly and Scollay, 1992; Mebius et al., 1996; Mebius et al., 1997; Yoshida et al., 1999; Yoshida et al., 2001). Über die Expression von IL-7R α und LT $\alpha_1\beta_2$ kann diese fötale Vorläuferzelle zwei unterschiedliche Signaltransduktionswege anschalten. Der IL-7R α abhängige Weg ist für die Peyer'sche Plaque Ontogenese von Bedeutung, aber nicht für die Organogenese von Lymphknoten. So besitzen Mäuse mit einer Defizienz für IL-7R α oder für Moleküle in dessen weiterem Signalweg, wie γ_c oder Jak3 keine Peyer'schen Plaques aber Lymphknoten (Adachi et al., 1998). Der LT $\alpha_1\beta_2$ / LT β Rezeptor abhängige Weg ist sowohl für Lymphknoten, als auch für die Peyer'sche Plaque Entwicklung essentiell (Alimzhanov et al., 1997; Banks et al., 1995; De Togni et al., 1994; Futterer et al., 1998; Koni et al., 1997). Eine Sonderstellung nehmen hier die mesenterialen Lymphknoten ein. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass LIGHT in der Organogenese der mesenterialen aber nicht anderer, peripherer Lymphknoten für ein fehlendes LT $\alpha_1\beta_2$ Molekül in der Aktivierung des LT β Rezeptor substituieren kann. Es ist also vorstellbar, dass die IL-7R α^+ LT β^+ CD4 $^+$ CD3 $^-$ Vorläuferzellen gerade im mesenterialen Lymphknoten zur LIGHT Expression angeregt werden können, während dies in peripheren Lymphknoten oder Peyer'schen Plaques nicht möglich ist. Analog hierzu konnte gezeigt

werden, dass die meisten $IL-7R\alpha^+$ Zellen im Intestinum durch IL-7 zur Expression von $LT\alpha_1\beta_2$ angeregt werden können (Yoshida et al., 2001). Abb. 4.1 zeigt ein hypothetisches Szenario für den Ablauf von Zellinteraktionen bei der Organogenese von Lymphknoten und Peyer'schen Plaques. Dieses Modell beinhaltet drei Interaktionspartner, die IL-7 produzierenden Initiatorzellen, die $LT\alpha_1\beta_2$ oder LIGHT exprimierenden Induktorzellen und die mesenchymalen Organisorzellen. Es ist aber ebenso denkbar, dass die initiale IL-7 Produktion durch die Organisorzellen selbst erfolgt.

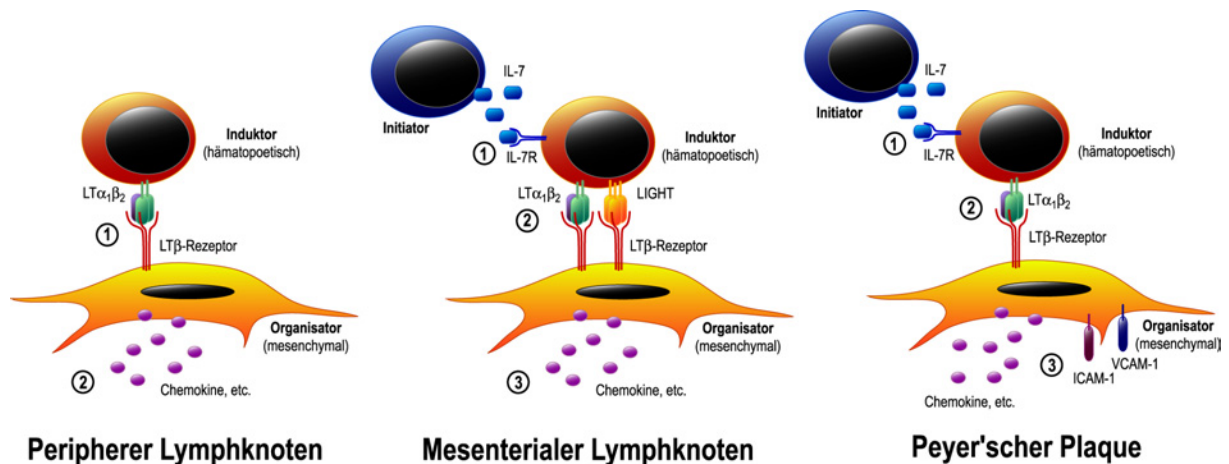


Abb. 4.1: Modell zur Interaktion von fötalen Vorläuferzellen in der Organogenese von Lymphknoten und Peyer'schen Plaques. Zunächst wird in den Anlagen der Peyer'schen Plaques und der mesenterialen Lymphknoten über Aktivierung des $IL-7R\alpha$ die Expression von $LT\alpha_1\beta_2$ bzw. LIGHT initiiert. Im Fall von mesenterialen und peripheren Lymphknoten ist die $LT\alpha_1\beta_2$ -Expression konstitutiv oder $IL-7R\alpha$ unabhängig reguliert. Die $LT\alpha_1\beta_2/LT\beta$ Rezeptor bzw. LIGHT/ $LT\beta$ Rezeptor Interaktion stimuliert die mesenchymalen Zellen und regt sie zur Produktion unterschiedlicher Chemokine an (modifiziert nach Nishikawa et al., 2000).

Nach der Etablierung der Interaktion zwischen Induktor und Organisor Zelle, führt eine Reihe von Ereignissen, wie die Produktion von Chemokinen, möglicherweise durch die Organisorzelle, zum Einwandern maturaer Lymphozyten und zur sukzessiven Etablierung einer komplexen Organ Mikroarchitektur.

Insgesamt erscheint der Prozeß der Lymphknoten und Peyer'schen Plaque Organogenese ähnlich dem einer T Zell vermittelten inflammatorischen Immunantwort. TNF und die Lymphotoxine wirken als wichtige Zytokine auf mesenchymales Bindegewebe und Gefäßendothelzellen, die daraufhin die folgenden Inflammationsschritte organisieren (Sacca et al., 1997). Inflammation und die Ontogenese lymphatischer Organe unterscheiden sich jedoch deutlich, indem dass eine Entzündungsreaktion im Normalfall ein transientes Ereignis ist, während die Organogenese zur permanenten Etablierung einer zellulären Architektur führt. Im Folgenden soll näher auf den zweiten Teilaspekt der biologischen Rolle von LIGHT als Mitglied der engeren TNF/LT Familie eingegangen werden, auf seine Funktion in der kostimulatorischen Aktivierung einer Immunantwort.

4.2 LIGHT als kostimulatorisches Molekül bei proliferativen T Zell Antworten *in vitro*

Bisherige Studien konzentrierten sich auf LIGHT als kostimulatorisches Molekül und seine Beteiligung an proliferativen T Zell Antworten und der Sekretion von Zytokinen (Tamada et al., 2000b; Tamada et al., 2000a). LIGHT^{-/-} Splenozyten reagieren jedoch normal auf eine Stimulation mit ConA. Lektine wie Concavalin A üben ihre aktivierende Wirkung über z.B. CD28 oder OX40 vermittelte Kostimulation aus (Higgins et al., 1999; Shahinian et al., 1993), was ein Fehlen von LIGHT substituieren kann. Im Gegensatz zu den vorliegenden Ergebnissen mit LIGHT defizienten Splenozyten führte die Zugabe von LT β Rezeptor-Fc Fusionsprotein oder HVEM-Fc Fusionsprotein zu einer deutlich verringerten [³H]-Thymidininkorporation nach Stimulation von WT Splenozyten mit ConA (Wang et al., 2001b). Für diese Diskrepanzen existieren zwei mögliche Erklärungen. Zum einen wird durch HVEM-Fc nicht nur LIGHT, sondern auch LT α_3 abgefangen, das in der Experimentalsituation mit LIGHT defizienten Splenozyten das Fehlen von LIGHT kompensieren kann. Zum anderen blockiert die Zugabe von LT β Rezeptor-Fc nicht nur LIGHT sondern auch LT $\alpha_1\beta_2$. Letzteres kann zwar nicht direkt zur Aktivierung von T Zellen beitragen, da diese keinen LT β Rezeptor exprimieren, eine indirekte stimulatorische Aktivität über die in der Kultur vorhandenen, den LT β Rezeptor tragenden Makrophagen, ist aber nicht auszuschliessen. Zudem ist in beiden Fällen die Existenz eines noch unbekanntes, dritten Liganden für den LT β Rezeptor oder HVEM möglich.

Nach Stimulation mit löslichem anti CD3 mAK, hingegen, zeigen LIGHT defiziente Splenozyten eine Reduktion im [³H]-Thymidineinbau, was eine essentielle Rolle eines von LIGHT gelieferten Kostimulus nach T Zell Rezeptor Aktivierung aufdeckt. Dies ist vergleichbar mit Beobachtungen, die in Experimenten mit OX40 defizienten T Zellen gemacht wurden (Pippig et al., 1999) oder bei der Anwendung von 4-1BB-Fc Fusionsproteinen (Hurtado et al., 1995). Untersucht man jedoch die Zellzyklus Aktivität nach anti CD3-Stimulation mittels eines CFSE Assays, ergab sich weder in der CD4⁺ noch in der CD8⁺ T Zell Subpopulation aus LIGHT^{-/-} Mäusen ein Unterschied zu WT Splenozyten. Eine Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse aus [³H]-Thymidineinbau und CFSE-Assay kann in der Annahme liegen, dass der [³H]-Thymidineinbau nicht ausschliesslich durch die Zellzyklus Aktivität beeinflusst ist, sondern auch durch die Zahl der an der Proliferationsantwort teilnehmenden Zellen. Letztere wird bestimmt durch den Eintritt der Zellen in den Zellzyklus aber auch durch das Überleben der Zellen. Da anhand der CFSE-Messung gezeigt werden konnte, dass die Zellteilung nicht durch LIGHT beeinflusst wird, ist es sehr wahrscheinlich, dass die geringere [³H]-Thymidininkorporation von LIGHT defizienten Splenozyten auf eine kürzere Überlebenszeit der T Zellen nach Stimulation des T Zell Rezeptor Komplexes zurückzuführen ist. Eine ganz ähnliche Situation findet sich auch bei Mäusen mit einer Defizienz für CD27, ein weiterer Rezeptor der TNF Superfamilie. Die Analyse dieser Tiere ergab, dass die Interaktion von CD27 mit seinem Liganden CD70 in der Immunabwehr gegen virale Infektionen bei der Generierung von primären und sekundären CD4⁺ und CD8⁺ T Zell Antworten eine wichtige Rolle spielt (Hendriks et al., 2000).

4.3 Die antivirale und antibakterielle Infektionsabwehr in Abwesenheit von LIGHT

Um antivirale Immunantworten in LIGHT defizienten Tieren zu überprüfen, wurden Infektionsexperimente mit Vesikulärem Stomatitis Virus durchgeführt. VSV ist ein zytopathisches, nichtsegmentiertes Negativ-Strang RNS Virus, das eng mit dem Rabies Virus verwandt ist (Wagner, 1987). Nach Infektion von Mäusen mit VSV ist eine frühe Antikörper Antwort zu beobachten, die die Dissemination des Virus in neuronale Gewebe verhindern kann und den Wirt vor einer progressiv paralytisch und schliesslich letal verlaufenden Erkrankung schützt (Lefrancois, 1984; Bachmann et al., 1997). Zusätzlich werden zelluläre zytotoxische Immunantworten generiert, die in an Tag 6 nach Infektion *ex vivo* nachweisbar sind. Es wurden jedoch bei LIGHT^{-/-} Mäusen keine Defekte in primären T Zell abhängigen und unabhängigen AK Antworten nach einer VSV Infektion beobachtet. Dies ähnelt der Situation, wie sie etwa in OX40- oder 4-1BB Ligand-defizienten Tieren auftritt (DeBenedette et al., 1999; Kopf et al., 1999), und unterscheidet sich deutlich von den Bedingungen in Abwesenheit von CD28 (Shahinian et al., 1993) oder CD40, wobei letzteres Molekül absolut essentiell ist für die Kollaboration von T und B Zellen (Fehr et al., 1996). Auch die *ex vivo* VSV-spezifischen CTL Antworten waren, sogar bei sehr niedrigen Infektionsdosen, durch ein Fehlen von LIGHT nicht beeinträchtigt. Dies ist wahrscheinlich durch die Fähigkeit anderer akzessorischer Moleküle, wie z.B. CD28 (Kundig et al., 1996), zu erklären, ausreichende Kostimulation in einer zytolytischen Immunantwort auf VSV zur Verfügung zu stellen und dadurch eine mögliche Beteiligung von LIGHT zu maskieren. Es bleibt jedoch aufzuklären, ob unterschiedliche virale Stimuli eine spezifische Funktion von LIGHT in der Pathogenabwehr aufdecken können. Die CD28 vermittelte Kostimulation etwa ist in verschiedenen viralen Infektionsmodellen von sehr unterschiedlicher Bedeutung: Während CD8⁺ T Zell Antworten gegen Infektionen mit Lymphozytischem Choriomeningitis Virus (LCMV) völlig unabhängig von einer CD28 initiierten Signaltransduktion sind (Shahinian et al., 1993; Andreasen et al., 2000; Zimmermann et al., 1997), zeigte sich die zelluläre Immunität gegen VSV, Influenza Virus und bestimmte Stämme von Vaccinia Virus als deutlich herabgesetzt in Abwesenheit oder bei Inhibition von CD28 (Shahinian et al., 1993; Andreasen et al., 2000; Liu et al., 1997; Lumsden et al., 2000; Sigal et al., 1998; Zimmermann et al., 1997). Als Erklärung für diese Variationen in der Immunabwehr wurden verschiedene viruspezifische Unterschiede, wie z.B. in der viralen Beladung des Organismus, in der Pathogenpersistenz und dem Grad der Inflammationsantwort, vorgeschlagen (Kundig et al., 1996; Bachmann et al., 1998). Zudem muß analysiert werden, ob die gleichzeitige Deletion mehrerer kostimulatorisch wirksamer Moleküle zu Immundefizienzen in der Virusabwehr führt. In der Tat deuten initiale Experimente mit LIGHT/CD28 doppelt defizienten Tieren das komplette Fehlen einer VSV-spezifischen CTL Aktivität an, während in CD28^{-/-} Kontrollmäusen noch ein gewisses Maß an lytischer Aktivität erhalten ist (nicht gezeigte Daten).

Zur Analyse einer Immunantwort gegen intrazelluläre Bakterien in LIGHT defizienten Mäusen wurde die Infektion mit dem gram-positiven Stäbchen *Listeria monocytogenes* gewählt, das hierfür ein gut charakterisiertes Modell darstellt (Kaufmann, 1993; Unanue, 1997). Im Verlauf einer systemischen Infektion erlangen Listerien Eintritt in die Leber und die Milz des Wirtes, wo sie Makrophagen und in der Leber auch Hepatozyten infizieren. Im Inneren dieser Zellen verlassen die Bakterien das Kompartiment des Phagosoms und gelangen in das Zytoplasma der Zellen, wo sie replizieren. Bedingt durch das intrazytoplasmatische Habitat werden listeriale Antigene auf dem MHC Klasse I Weg prozessiert und präsentiert.

Als Konsequenz hieraus wird eine potente antilisteriale CD8⁺ T Zell Antwort generiert (Kaufmann, 1993; Mittrucker et al., 2000). Andererseits führt die Präsentation von oft sekretierten bakteriellen Proteinen auf dem MHC Klasse II Weg zusätzlich zur Aktivierung von CD4⁺ T Zellen (Ladel et al., 1994; Mittrucker et al., 2000). Die Interaktion beider T Zell Subpopulationen führt zur endgültigen Eliminierung der Organismen aus dem Wirt und zur Bereitstellung eines Pools von Gedächtnis T Zellen, die in der Lage sind, eine schnellere Zweitantwort des Immunsystems auszuführen (Unanue, 1997; Bancroft et al., 1986; Bhardwaj et al., 1998). Die Infektion von LIGHT^{-/-} Mäusen mit titrierten Dosen von *L. monocytogenes* ergab keine signifikant erhöhte Suszeptibilität dieser Tiere im Vergleich zu Wildtyp Kontrolltieren. Weder in der Phase der angeborenen Immunabwehr (24 - 72 h nach Infektion), die hauptsächlich von einwandernden aktivierten Makrophagen und neutrophilen Granulozyten bestimmt ist, noch der adaptiven Immunantwort (72 hrs nach Infektion und später), in der erste T Lymphozyten rekrutiert und aktiviert werden, war eine erhöhte Letalität bei LIGHT defizienten Tieren zu beobachten. Die Bestimmung der Bakterienzahlen in Leber und Milz erbrachte aber einen ersten Hinweis auf eine mögliche Defizienz von LIGHT^{-/-} Mäusen bei der Beseitigung der intrazellulären Erreger aus dem Organismus. An Tag 12 nach Infektion waren in der Leber aller LIGHT defizienter Tiere noch bis zu 10⁶ Listerien nachweisbar, dagegen waren Wildtyp Tiere schon zu 50 % pathogenfrei. Ob tatsächlich das Fehlen von LIGHT zu einer chronischen Listeriose führt, wie sie von SCID Mäusen bekannt ist (Bancroft et al., 1986; Bhardwaj et al., 1998; Unanue, 1997), muß anhand höherer Mauszahlen und zusätzlicher Infektionsdosen und Untersuchungszeitpunkten eingehender geklärt werden.

4.4 LIGHT als wichtiger Mediator einer allogenen Transplantatabstossung

Es war bereits bekannt, dass CD28- oder 4-1BB-vermittelte Signale alleine für die Abstossung allogener Transplantate nicht essentiell sind (DeBenedette et al., 1999; Kawai et al., 1996; Maier et al., 2001). Das Fehlen von CD28 in Kombination mit 4-1BB Ligand führt jedoch zu einer Verzögerung der allogenen Transplantatabstossung von bis zu 14 Tagen (DeBenedette et al., 1999). Ebenso führt die gleichzeitige Blockade von CD28 und CD40 zu einem verlängerten Transplantatüberleben. In Abhängigkeit von der jeweiligen Experimentalsituation wurden Verlängerungen von 15 bis über 50 Tagen erzielt (Larsen et al., 1996; Li et al., 1999; Trambley et al., 1999). In der vorliegenden Studie resultierte das Fehlen von entweder LIGHT oder CD28 in einer Abstossungszeit allogener Hauttransplantate, die mit der von Wildtyp Rezipienten vergleichbar war. Ein ähnliches Bild ergab sich, wenn männliche Spenderhaut auf weibliche Rezipientenmäuse desselben Inzuchstammes transplantiert wurde. In dieser Situation wird das Immunsystem nur durch einen abgeschwächten Stimulus aktiviert, nämlich durch einen Unterschied in einem Gen, das zum Nebenhistokompatibilitätsloкус zu zählen ist, während die Haupthistokompatibilitätsloci genau übereinstimmen. Auch hier ergaben sich keine Unterschiede in Abstossungsreaktionen der LIGHT defizienten im Vergleich zu Wildtyp Tieren. Beide Experimentalgruppen stießen die Spenderhaut in einem Zeitraum von 22 - 45 Tagen ab, wie dies bereits in der Literatur für Wildtyp Mäuse beschrieben wurde (Bailey and Hoste, 1971; Bailey, 1971). Eine kombinierte Defizienz in LIGHT und CD28 führte dagegen zu einer Überlebenszeit für allogene Hauttransplantate von bis zu 19 Tagen, bis zu 6 Tage länger als die der Wildtyp Kontrolltiere. Diese Beobachtung spiegelt

aller Wahrscheinlichkeit nach eine wichtige Rolle der LIGHT-HVEM Signaltransduktion in einer frühen Phase der T Zellaktivierung wider, in deren späterem Verlauf andere kostimulatorische Moleküle, wie z.B. 4-1BB/4-1BB-Ligand, CD40/CD154, CD27/CD70 und OX40/OX40-Ligand (Harrop et al., 1998b),(Lane, 2000; Watts and DeBenedette, 1999) verstärkt exprimiert werden und damit für fehlende LIGHT/HVEM oder LIGHT/LT β Rezeptor Interaktionen substituierend wirksam werden können. Zusätzlich bleibt aufzuklären, ob LIGHT an einer NK Zell Aktivierung beteiligt ist, wie die für 4-1BB beschrieben wurde (Melero et al., 1998), und ob daher das verlängerte Transplantatüberleben im vorliegenden Fall nicht nur auf Defizienzen bei CD8⁺ und/oder CD4⁺ T Zellen, sondern auch bei NK Zellen zurückzuführen ist.

Um die zugrundeliegenden Mechnismen weiterführend zu untersuchen, wurden allogene Immunantworten *in vitro* mit Hilfe von "Mixed Lymphocyte Reactions" in Abwesenheit von LIGHT analysiert. Bemerkenswerterweise ist LIGHT absolut notwendig, um eine effektive allogene CTL Antwort *in vitro* zu generieren. Der Grund hierfür könnte in der reduzierten Häufigkeit von aktivierten CD8⁺ T Zellen zu finden sein, wie sie in der allogenen MLR auftritt. Desweiteren werden geringere Mengen von Zytokinen im MLR Kulturüberstand von LIGHT defizienten Splenozyten gemessen. Insbesondere schliesst dies T Helferzell Typ 1 und Typ 2 spezifische Zytokine ein, was in Kontrast steht zu früheren Beobachtungen, bei denen eine Blockade der LIGHT Kostimulation zu einer Abnahme vor allem bei den Th1 Zytokinen führte (Tamada et al., 2000b). Dass die alleinige Abwesenheit von LIGHT *in vitro* zu weitaus dramatischeren Defekten in anti-allogenen Immunantworten führt, als dies *in vivo* zu beobachten ist, ist nicht weiter verwunderlich. Ähnliches wurde auch für die Abwesenheit von CD28-vermittelten Signaltransduktionsmechanismen beschrieben. Während *in vivo* keine Verzögerung bei der Abstossung von allogenen Hauttransplantaten in CD28 defizienten Rezipienten im Vergleich zu WT Rezipienten auftrat (Kawai et al., 1996), zeigte sich eine deutliche Reduktion von MLR induzierten CTL Antworten beim gleichzeitigen Fehlen beider bekannter Liganden für CD28, B7-1 und B7-2, *in vitro* (McAdam et al., 2000).

Im Lichte neuerer Beobachtungen erscheint es möglich, dass die Effekte der LIGHT Defizienz in der allogenen CTL Antwort, und daraus resultierend die verzögerten Transplantatabstossung, indirekt aus Defekten bei der Reifung Dendritischer Zellen in Abwesenheit von LIGHT resultiert. Morel *et al.* konnten zeigen, dass LIGHT in Synergismus mit CD40L (CD154) die Maturierung von Dendritischen Zellen induziert, was zur einer erhöhten Zytokinproduktion und zur Potenzierung allogener T Zellantworten führt (Morel et al., 2001). Knochenmarks gereifte Dendritische Zellen aus LIGHT defizienten Mäusen, die *in vitro* in Gegenwart von CpG Oligonukleotiden, LPS oder poly I:C maturiert wurden, zeigten jedoch keine Defekte bei der Hochregulation von Oberflächenmarkern, wie MHC Klasse II, CD40, B7-1 und B7-2, wie auch bei der intrazellulär nachgewiesenen Produktion von IL-12. Hieraus ist zu schliessen, dass LIGHT defiziente Dendritische Zellen keine intrinsischen Maturierungsdefekte aufweisen. Interessanterweise exprimieren nur immature Dendritische Zellen LIGHT auf der Zelloberfläche und regulieren das Molekül herunter, sobald ein Maturierungssignal gegeben wird (Tamada et al., 2000a). Von T Zellen dagegen wird LIGHT erst nach Stimulation z.B. durch PMA/Ionomycin exprimiert. Bei diesen Zellen wurde allerdings eine reziproke Regulation von LIGHT und seinem Rezeptor, HVEM, festgestellt. Letzterer wird auf ruhenden T Zellen ausgeprägt und nach Aktivierung herunterreguliert (Morel et al., 2000). Dieses Expressionsmuster beider Moleküle, LIGHT und HVEM, läßt vermuten, dass Ligand und Rezeptor in einer frühen Phase der adaptiven Immunantwort von Wichtigkeit sind, um initial eine T

Zellaktivierung zu steuern oder zu verstärken, bevor CD28 oder andere kostimulatorische Moleküle dies übernehmen. Der Grund für diese Komplexität des kostimulatorischen Systems liegt wahrscheinlich in den spezifischen Funktionen der einzelnen kostimulatorischen Partnermoleküle, die wiederum unabhängig von anderen kostimulatorischen Molekülsets reguliert sind.

4.5 Beziehung von biologischer Funktion und chromosomaler Lokalisation von Subgruppen der TNF Liganden Superfamilie

Im Rahmen dieser Arbeit, konnte die chromosomale Lokalisation von *light* in der Maus auf Chromosom 17 in einen Bereich mit enger Nachbarschaft zu *cd27l* aber ausserhalb des MHC definiert werden. Für den Menschen wurden bereits eingehende Studien über die genomische Organisation unterschiedlicher TNF Familienmitglieder durchgeführt und festgestellt, dass viele dieser Gene in Clustern angeordnet sind. LIGHT konnte durch Vergleich von humanen BAC Klonen in eine Genregion eingeordnet werden, die auch die beiden TNF Moleküle CD27 Ligand und 4-1BB Ligand enthält (Granger et al., 2001). Zusätzlich liegt das Gen für den Komplementfaktor C3 in unmittelbarer Nachbarschaft zu *light*. *c3*, *light*, *cd27l* und *4-1bbl* liegen insgesamt auf dem humanen Chromosom 19 in einem Bereich, der ca. 370 kb umspannt. Die enge Kopplung dieser Gene lässt es als sehr wahrscheinlich erscheinen, dass dieser Cluster durch Genduplikation entstanden ist (Lewis, 1978). Zudem liegt *light* im humanen Genom im Bereich Chr19p13.3 innerhalb einer Genregion, die paralog zum MHC auf Chr6p21.3 ist (Abi et al., 1999; Kasahara, 1999). Das Chr19p13.1-3 MHC Paralog ist eine von vier Regionen die wahrscheinlich durch chromosomale Duplikationen entstanden sind und Gene für TNF Superfamilienmitglieder enthalten, wie z.B. *fasl* und *ox40l* auf Chromosom 1 und *cd30l* und *vegi* auf Chromosom 9 (Flajnik and Kasahara, 2001). Allgemein enthalten diese paraloge Regionen aber nicht nur Gene der TNF Familie sondern, neben anderen konservierten Genmarkern, auch MHC Klasse I und Komplement verwandte Gene. Der *light* Locus ist dem *tnf* Locus sehr ähnlich, in dem sich *lt β* , *tnf* und *lt α* in enger Nachbarschaft zu den Genen für die Komplementfaktoren C2 und C4 innerhalb des MHCs befinden (Dunham et al., 1987; Browning et al., 1993). Es ist bemerkenswert, dass innerhalb der Komplement Protein Familie C3 im Sequenzhomologievergleich dem C4 Protein am ähnlichsten ist (Hughes, 1994). Auch LIGHT und LT β besitzen eine hohe Sequenzhomologie aber auch funktionelle Ähnlichkeit in Bezug auf ihre Rezeptorbindungseigenschaften (Mauri et al., 1998), und *lt β* ist neben dem *c4* Gen lokalisiert. Es liegt somit die Vermutung nahe, dass der TNF/LT Locus als Duplikation aus dem LIGHT Locus hervorgegangen ist oder umgekehrt. *cd27l* und *4-1bbl* besitzen allerdings nur drei Exone während *light*, *lt β* , *tnf* und *lt α* jeweils aus vier Exonen bestehen. Zudem liegen der LIGHT und der TNF/LT Locus in der Maus auf dem selben Chromosom, aber in einigem Abstand zueinander. Im Laufe der Evolution folgt auf eine Duplikation oft eine Translokation, die den Gencluster entweder auf ein anderes Chromosom bringt oder den Cluster insgesamt auflöst. Zwischen der Duplikation des LIGHT oder des TNF/LT Locus und der Lokalisation beider Genregionen auf dem selben Chromosom aber in deutlichem Abstand voneinander müssten also mindestens zwei Translokationsvorgänge liegen. Viel wahrscheinlicher ist es aber, dass der LIGHT Locus nicht direkt aus dem TNF/LT Locus hervorgegangen ist. Die Analyse der genomischen Organisation der TNF Moleküle auf Chromosom 1 erbrachte eine deutliche Ähnlichkeit zum

LIGHT Locus. Die Orientierung der Gene und die Organisation der Exone von *fasl* und *light* entsprechen sich genau und *aitrl* und *ox40l* besitzen wie auch *cd27l* und *4-1bbl* nur drei Exone (Granger et al., 2001). Obwohl die Gene des FasL Locus sich über einen grösseren genomischen Bereich erstrecken als die Gene des LIGHT oder des TNF/LT Locus, ist die Sequenzähnlichkeit auf Aminosäureebene zwischen den Proteinen des FasL Locus und des LIGHT Locus stärker ausgeprägt als zwischen den Proteinen des LIGHT und des TNF/LT Locus. Auf funktioneller Ebene ist die gemeinsame Bindungsfähigkeit von LIGHT und FasL an DcR3 ein weiterer Beweis für die nahe Verwandtschaft dieser Gene (Pitti et al., 1998; Yu et al., 1999). Die humanen MHC Paraloge auf Chromosom 1 und 19 erscheinen somit untereinander näher verwandt als zum Paralog auf Chromosom 6. Berücksichtigt man die enge Kopplung von *light* und *c3*, das aufgrund funktioneller und phylogenetischer Argumente als das Primordialgen für *c4* und *c5* angesehen wird (Hughes, 1994), könnte *light* wiederum das Primordialgen für *fasl* und *ltβ* sein. Für den LIGHT und den TNF/LT Locus ist die chromosomale Situation in der Maus konserviert (Misawa et al., 2000; Tesselaar et al., 1997; Ware et al., 1995). Im Bereich des FasL Locus (Lynch et al., 1994) ist der Genlocus für GITRL, das murine Ortholog für AITRL (Kwon et al., 1999b), noch nicht bekannt und wurde nach Gesichtspunkten der Synthese dort eingeordnet.

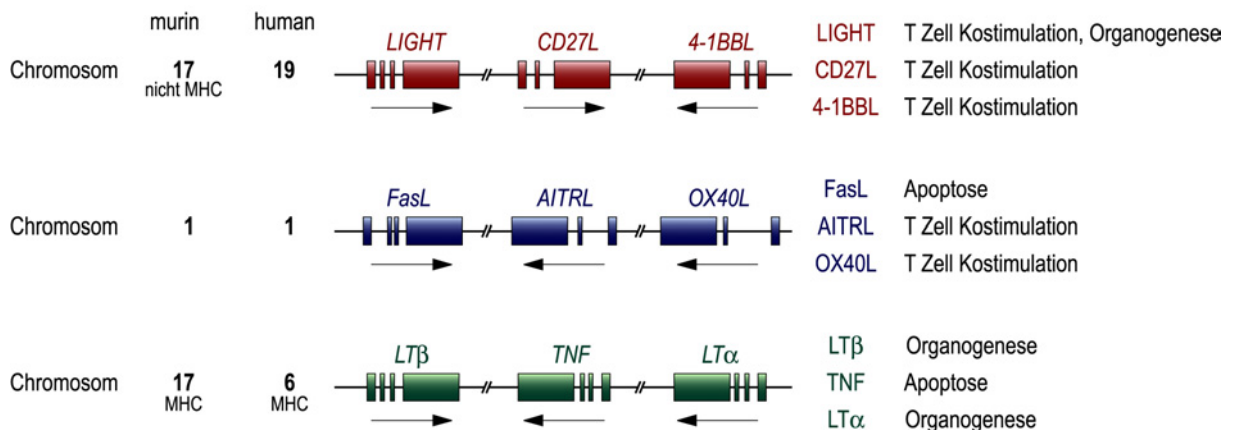


Abb. 4.2: Organisation der Gene der TNF Superfamilie in paralogen chromosomalen Regionen. Angegeben ist die Anordnung paraloger humaner Genloci der TNF Superfamilie in Richtung von Zentromer zu Telomer und die chromosomale Lokalisation in Mensch und Maus. Für die murine Situation existiert noch keine Information über die tatsächliche Lokalisation von GITRL (murines Ortholog für AITRL). Hier angegeben ist die anhand von Synthese wahrscheinlichste chromosomale Lokalisation. Pfeile zeigen die Transkriptionsrichtung der einzelnen Gene, ausgefüllte Rechtecke symbolisieren Exone. (modifiziert nach Granger and Ware, 2001)

In Hinblick auf die biologische Funktion der TNF Superfamilien Mitglieder dieser drei paralogen Regionen liegt der Hauptanteil im Bereich der T Zell Aktivierung oder der Beseitigung der aktivierten T Zellen. Die Liganden für CD27, 4-1BB und OX40 wie auch LIGHT agieren kostimulatorisch für primäre oder sekundäre T Zellantworten (Watts and DeBenedette, 1999), während TNF und Fas Ligand über Induktion von Apoptose aktivierte T Zellen aus dem System entfernt (Screaton and Xu, 2000). In Erweiterung dieser Thematik sind $LT\alpha$ und $LT\beta$ essentiell an der Differenzierung von $CD4^+$ Vorläuferzellen für Lymphknoten, Peyer'sche Plaques, NK und NKT Zellen (Mebius et al., 1997; Yoshida et al., 2001) beteiligt. Auch für LIGHT konnte in dieser Arbeit eine Beteiligung an der Organogenese der mesenteria-

len Lymphknoten nachgewiesen werden. Dagegen haben BAFF und CD40 Ligand, TNF Familienmitglieder, die in andere genomische Bereiche kartiert wurden, eine wichtige Rolle in der Differenzierung und im Überleben von B Zellen, einem anderen Ast der Immunabwehr (Batten et al., 2000; Liu and Banchereau, 1997; Schiemann et al., 2001; Thompson et al., 2000; Thompson et al., 2001; Tsubata, 1999). Zweifelsohne ist die in der Evolution konservierte enge genetische Kopplung von TNF Liganden an Antigen-präsentierende MHC Moleküle kein Zufall, sondern spiegelt vielmehr ihre bedeutende Wichtigkeit in der Feinregulation der Antigenerkennung und Immunaktivierung wider.

4.6 Ausblick

Zusammenfassend läßt sich sagen, dass die vorliegenden Ergebnisse eine Funktion von LIGHT in der Organogenese der sekundären lymphatischen Organe und eine wichtige Beteiligung an der Kostimulation von T Zell vermittelten Immunantworten definiert.

Im Hinblick auf die Rolle von LIGHT in der lymphatischen Organogenese könnte zunächst die Expression von LIGHT in der $IL-7R\alpha^+ LT\beta^+ CD4^+ CD3^-$ Vorläuferzellpopulation mittels RT-PCR Analyse überprüft werden. Da im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass LIGHT selektiv nur an der Ausbildung des mesenterialen Lymphknotens mitbeteiligt ist, wäre es interessant, aus den Anlagen der peripheren und mesenterialen Lymphknoten muriner Embryonen und neonataler Mäusen diese $IL-7R\alpha^+ LT\beta^+ CD4^+ CD3^-$ Vorläuferzellen zu isolieren und auf LIGHT mRNA zu überprüfen. Es ist auch denkbar, dass in Vorläuferzellen aus mesenterialen Lymphknotenanlagen erst nach Stimulation die LIGHT bzw. auch die $LT\alpha_1\beta_2$ Expression induziert wird. In diesem Fall wäre es interessant die Identität des Stimulus zu identifizieren. Ein naheliegender Kandidat wäre IL-7, das bei den meisten intestinalen $IL-7R\alpha^+$ Zellen zur Induktion von $LT\alpha_1\beta_2$ führt (Yoshida et al., 2001). Auch mittels "whole mount" *in situ* Hybridisierung der mesenterialen Region könnte die Expression von LIGHT direkt im entsprechenden Gewebe nachgewiesen werden, wie dies bereits für die ICAM-1 und VCAM-1 Expression im entstehenden Peyer'schen Plaque gezeigt wurde (Yokota et al., 1999; Yoshida et al., 1999; Honda et al., 2001).

Für die eingehendere Charakterisierung des Defekts in der T Zell Kostimulation wird es hilfreich sein, die T Zell Population auf ein MHC Klasse I bzw. Klasse II restringiertes, oligoklonales Repertoire zu reduzieren, indem die LIGHT Defizienz in T Zell Rezeptor transgene Mausstämmen eingekreuzt wird (Kurts et al., 1996; Barnden et al., 1998; Murphy et al., 1990). Diese Systeme sollten eine detaillierte Analyse des Beitrags der LIGHT vermittelten Kostimulation spezifisch für die $CD4^+$ oder die $CD8^+$ T Zell Subpopulationen erlauben. Gleichzeitig würde dies die Untersuchung des Einflusses einer LIGHT Abwesenheit auf die positive oder negative Selektion der T Zellen im Thymus erleichtern. Bisher wurde gezeigt, dass es bei transgener Überexpression von LIGHT zu einer starken Atrophie des Thymus kommt mit reduzierten $CD4/CD8$ doppelt positiven Thymozytenzahlen verursacht durch erhöhte Apoptoseaktivität (Wang et al., 2001a). Andererseits wurde nach Blockierung der LIGHT Aktivität durch Gabe von Rezeptor-Fusionsproteinen die negative Selektion autoreaktiver Thymozyten deutlich inhibiert (Wang et al., 2001a). Da in dieser Studie eine zusätzliche Beteiligung anderer Liganden der jeweiligen Rezeptor-Fusionsproteine nicht ausgeschlossen werden kann und zudem nur die Negativselektion der $CD8^+$ transgenen T Zellen untersucht werden konnte, sind aus Untersuchungen mit LIGHT defizienten TZR

transgenen Mausstämmen für CD4⁺ und CD8⁺ T Zellen weiterführende Erkenntnisse über die Rolle von LIGHT in der T Zell Selektion zu erwarten. Weiterführend könnte auch das Auftreten von Autoimmundefekten bei LIGHT defizienten Tieren untersucht werden, verursacht durch einen möglichen Defekt in der Generierung oder Aufrechterhaltung der zentralen Toleranz.

Die Primär- und Sekundärantworten auf virale und bakterielle Stimuli könnten mit Hilfe der MHC Tetramer Technik genauer analysiert werden (Altman et al., 1996; Busch et al., 1998). Eine genauere Untersuchung mittels MHC Tetrameren beladen mit Listerien- oder VSV-spezifischen Peptiden kann Aufschluss bringen über Quantität und Kinetik der T Zell Antworten (Busch et al., 1998; Busch et al., 1999; Mittrucker et al., 2000).

Um die Funktion von LIGHT in der Transplanatabstossung eingehender zu untersuchen, ist eine Ausweitung des Tiermodells auf das der allogenen Herztransplantation denkbar. Da Herztransplantate schwächere Immunantworten auslösen, als das von Hauttransplantaten bekannt ist (Isakov et al., 1979; Warren et al., 1973), könnte ein deutlicherer Effekt verursacht durch das Fehlen von LIGHT alleine oder eine doppelte Defizienz von LIGHT und CD28 zu beobachten sein. Ausserdem sollten zelluläre Infiltrate in die Transplantate nach Haut- oder Herztransplantation näher charakterisiert werden. Dies ist einerseits durch Immunhistochemie, bei Herztransplantaten aber auch sehr detailliert mittels FACS Analyse möglich (Maier et al., 2001).

Völlig unaufgeklärt ist die für LIGHT vorgeschlagene Rolle in der Tumormunität (Hurwitz et al., 2000; Yu et al., 1999; Zhai et al., 1998; Tamada et al., 2000b). Denkbar wären Studien der Tumorabstossung mit stark immunogenen allogenen Tumoren, wie dem Mastozytom P815 (Tamada et al., 2000b), oder schwächer immunogenen syngenen Tumoren, wie dem T Zell Lymphom EL-4, in LIGHT defizienten Mäusen.

Grosses Interesse herrscht auch an den spezifischen Aufgaben der LIGHT Expression auf Dendritischen Zellen als professionellen APCs im Vergleich zur Expression von LIGHT auf T Zellen als eigentlichen Effektor Zellen. Ein neuer experimenteller Ansatz zur Aufklärung dieser Problemstellung, bietet sich in einer neuartigen Abwandlung des CRE/loxP Rekombinationssystems (Rajewsky et al., 1996). Das CRE Rekombinase System aus dem Bakteriophagen P1 (Sternberg et al., 1981; Sternberg and Hamilton, 1981) fand bereits in zahlreichen Studien zur konditionellen Geninaktivierung Anwendung, wobei allerdings oft eine zu geringe Rekombinationseffizienz zu einer Restexpression des zu inaktivierenden Gens führte. Ziel eines hierzu komplementären Ansatzes ist es, eine Situation zu schaffen, in der ein spezifisches Gen in allen Geweben der Maus in Abwesenheit von CRE deletiert ist. Durch CRE-Rekombination kann die Genexpression spezifisch in einem Gewebe oder Zelltyp wieder angeschaltet werden, wobei man nun nicht auf eine absolute Rekombinationseffizienz angewiesen ist, um eine ausreichende Genexpression zu erreichen. Praktisch generiert man die gewünschte Situation durch Einbau einer von loxP Sequenzen flankierten "Trap"-Kassette in das erste Intron des zu inaktivierenden Gens (Abb. 4.3). Diese "Trap"-Kassette enthält eine Spleiss-Akzeptor Sequenz gefolgt von drei Stop-Codons in allen drei Leserahmen, sodass ein Spleissereignis vom endogenen Exon I auf die "Trap"-Kassette erfolgt und die Proteintranslation abbricht. Der zweite Teil der "Trap"-Kassette besteht aus einer internen ribosomalen Eintritts Sequenz (IRES) gefolgt von einem LacZ-Reporter Gen mit Polyadenylierungssignal und einem "Down stream Element" (DSE). Das IRES Element erlaubt die

bicistronische Expression einer mRNA unter dem selben Promotor, im vorliegenden Fall wird das Reporter-gen also unter dem endogenen Promotor des inaktivierten Gens exprimiert. Die DSE Sequenz wurde als eines von mehreren Elementen definiert, die ein Pausieren der eukaryonten RNS Polymerase II nach Erreichen des Polyadenylierungssignales induziert. Dieses Pausieren führt zur effizienten Terminierung der Transkription (Enriquez-Harris et al., 1991) und verhindert im vorliegenden Fall ein Durchlesen auf das nächstgelegene endogene Exon des zu inaktivierenden Gens. Insgesamt wird durch ein Einbringen der "Trap"-Kassette in Abwesenheit von CRE das Gen inaktiviert, wobei gleichzeitig Expressionsstudien unter Ausnutzung des LacZ-Reportergens möglich werden. Durch CRE induzierte Rekombination kann die gesamte "Trap"-Kassette wieder aus dem Genlokus entfernt werden, wonach nur noch eine loxP Sequenz innerhalb des Introns verbleibt und die Genexpression wieder hergestellt werden kann.

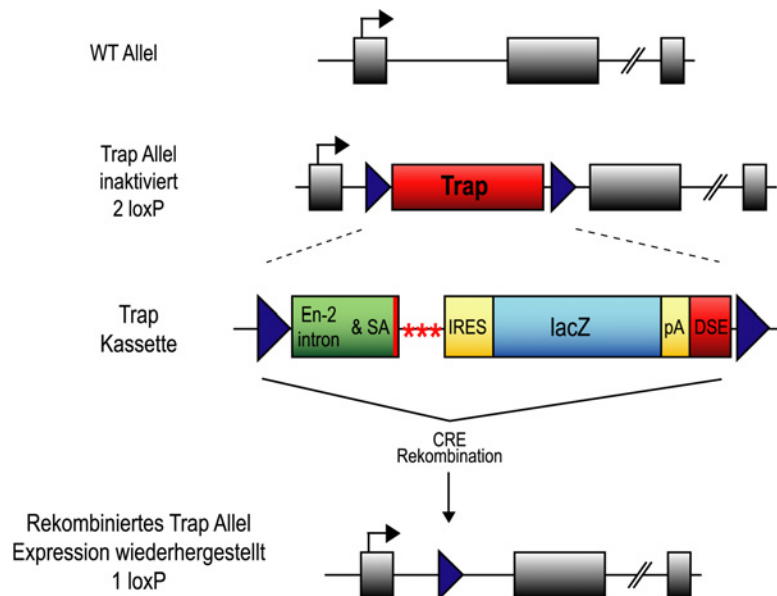


Abb. 4.3: Schematische Darstellung einer gewebespezifisch rekonstituierbaren Gendefizienz. Gezeigt ist ein hypothetisches Gen bestehend aus drei Exons, in das die von 2 loxP Sequenzen (Dreiecke) flankierte "Trap"-Kassette mittels homologer Rekombination eingebracht wurde. Die einzelnen Elemente der "Trap"-Kassette sind aus der Ausschnittsvergrößerung ersichtlich. Nach CRE-induzierter Rekombination wird die "Trap"-Kassette wieder aus dem Locus entfernt, wobei nur eine loxP Sequenz im Intron des Genlokus verbleibt und die Genexpression wieder erfolgen kann. En-2 intron & SA, 3' Bereich eines Introns des *engrailed2* Gens mit Spleiss-Akzeptorsequenz; rote Sterne, drei Stop Codons in drei Leserahmen; IRES, Interne Ribosomale Eintritts Sequenz; lacZ, lacZ Reportergen; pA, Polyadenylierungssignal; DSE, Down Stream Element.

Die praktische Funktionalität dieses theoretischen Ansatz konnte bereits am Beispiel einer rekonstituierbaren Defizienz in der Janus Kinase 2 (Jak2) der Maus nachgewiesen werden (Scheu S, Fütterer A und Pfeffer K, unveröffentlicht). Durch Einbringung der oben beschriebenen "Trap"-Kassette in das erste Intron des *jak2* Gens konnte der Phänotyp der konventionellen "Knock Out" Maus rekapituliert werden. Jak2-defiziente Tiere sterben in utero an Tag 12,5 der Embryonalentwicklung verursacht durch einen Block in der definitiven Hämatopoese (Neubauer et al., 1998; Parganas et al., 1998). Nach Verkreuzung von *Jak2^{+Trap}* Mäusen (heterozygot für das Trap Allel) mit Tieren die ubiquitär CRE

exprimieren, wurden phänotypisch unauffällige, lebende Mäuse geboren, die auf beiden Allelen ein loxP Signal im ersten Intron des *jak2* Gens tragen. Dies zeigt, dass nach Entfernung der "Trap"-Kassette aus dem Genom tatsächlich das betroffene Gen wieder vollkommen rekonstituiert werden kann. In einem analogen Ansatz könnte eine konditionell rekonstituierbare Mausmutante für LIGHT generiert werden, die nach Verkreuzung mit entsprechenden CRE-Mäusen LIGHT ausschliesslich auf T Zellen oder Dendritischen Zellen exprimiert. Mit Hilfe dieses Experimentalansatzes könnte eindeutig geklärt werden, auf welcher Zellpopulation die Expression obligat ist, um beispielsweise eine uneingeschränkte allogene Transplantatabstossung in Abwesenheit von CD28 oder die Ausbildung von mesenterialen Lymphknoten in Abwesenheit von LT β zu gewährleisten.

5 ZUSAMMENFASSUNG

LIGHT, ein vor kurzem entdecktes neues Mitglied der TNF Superfamilie, wurde als Ligand für den LT β Rezeptor, HVEM und DcR3 beschrieben. In der vorliegenden Arbeit wurde LIGHT durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen der Maus inaktiviert, wodurch die Funktion von LIGHT *in vivo* studiert werden konnte.

Im Gegensatz zu Mausmutanten für alle übrigen Liganden der engeren TNF/Lymphotoxin Familie weisen LIGHT defiziente Mäuse keinerlei Defekte in der Ausbildung sekundärer lymphatischer Organe, wie mesenterialer und peripherer Lymphknoten, der Milz oder Peyer'scher Plaques auf. In Mäusen mit einer doppelten Gendefizienz für LIGHT und LT β , die somit keinen der für den LT β Rezeptor beschriebenen Liganden exprimieren, kommt es zu einem Rückgang im Auftreten der mesenterialen Lymphknoten, die in LT β einfach defizienten Mäusen erhalten sind. Die Milzarchitektur von LIGHT/LT β doppelt defizienten Tieren ähnelt der von LT β einfach defizienten Tieren und ist in einem deutlich geringeren Ausmaß desorganisiert als dies in LT β Rezeptor^{-/-} Tieren der Fall ist. Für LIGHT konnte also eine kooperative Rolle zusammen mit LT β in der Organogenese der mesenterialen Lymphknoten identifiziert werden, während man im Hinblick auf die Ausbildung einer korrekten Mikroarchitektur der Milz auf die Existenz eines noch unbekanntes dritten Liganden für den LT β Rezeptor spekulieren kann.

Die Funktion von LIGHT als kostimulatorisches Molekül in der T Zellaktivierung konnte in einer Reihe von *in vitro* und *in vivo* Experimenten gezeigt werden. So ist die proliferative Antwort von LIGHT defizienten Splenozyten nach Stimulierung des T Zell Rezeptors *in vitro* reduziert. Da sich dies nur in einer Erniedrigung der [³H]-Thymidininkorporation bei intakter Zellzyklusaktivität widerspiegelte, liegt die Vermutung nahe, dass LIGHT für das Überleben von aktivierten T Zellen von Bedeutung ist. Gegenüber viralen Erregern wie VSV oder bakteriellen Pathogenen wie *Listeria monocytogenes* wurden keine Defekte in der Immunabwehr oder eine erhöhte Suszeptibilität von LIGHT defizienten Tieren festgestellt, jedoch geben erste Experimente Hinweise auf eine Kooperation zwischen LIGHT und CD28 in der VSV-Abwehr und auf einen Defekt bei der Beseitigung der Listerien aus dem System von LIGHT defizienten Tieren. LIGHT agiert synergistisch mit CD28 bei der Abstossung allogener Hauttransplantate *in vivo*. Als Ursache hierfür konnten *in vitro* deutlich herabgesetzte zytotoxische T Zellantworten, eine geringere Zytokinproduktion und ein erniedrigtes Verhältnis von aktivierten CD8⁺ zu CD4⁺ T Lymphozyten nach Stimulation in einer allogenen MLR identifiziert werden. Interessanterweise erstreckt sich die Reduktion in der Zytokinproduktion nicht wie bisher beschrieben hauptsächlich auf die T Helfer Zell Typ 1 Antwort, sondern auch auf die typischen T Helfer Zell Typ 2 Zytokine. Ein intrinsischer Defekt in der Maturierung von LIGHT defizienten Dendritischen Zellen konnte als mögliche Ursache ausgeschlossen werden.

Für LIGHT konnten zusammengefasst eine kooperative Rolle in der Ontogenese sekundärer lymphatischer Organe und eine wichtige kostimulatorische Funktion bei der T Zellaktivierung definiert werden.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Abi,R.L., McDermott,M.F., and Pontarotti,P. (1999). The MHC big bang. *Immunol. Rev.* 167, 33-44.
- Adachi,S., Yoshida,H., Honda,K., Maki,K., Saijo,K., Ikuta,K., Saito,T., and Nishikawa,S.I. (1998). Essential role of IL-7 receptor alpha in the formation of Peyer's patch anlage. *Int. Immunol.* 10, 1-6.
- Aggarwal,B.B. and Natarajan,K. (1996). Tumor necrosis factors: developments during the last decade. *Eur. Cytokine Netw.* 7, 93-124.
- Akiba,H., Miyahira,Y., Atsuta,M., Takeda,K., Nohara,C., Futagawa,T., Matsuda,H., Aoki,T., Yagita,H., and Okumura,K. (2000). Critical contribution of OX40 ligand to T helper cell type 2 differentiation in experimental leishmaniasis. *J. Exp. Med.* 191, 375-380.
- al Shamkhani,A., Birkeland,M.L., Puklavec,M., Brown,M.H., James,W., and Barclay,A.N. (1996). OX40 is differentially expressed on activated rat and mouse T cells and is the sole receptor for the OX40 ligand. *Eur. J. Immunol.* 26, 1695-1699.
- Alexopoulou,L., Pasparakis,M., and Kollias,G. (1998). Complementation of lymphotoxin alpha knockout mice with tumor necrosis factor-expressing transgenes rectifies defective splenic structure and function. *J. Exp. Med.* 188, 745-754.
- Alimzhanov,M.B., Kuprash,D.V., Kosco-Vilbois,M.H., Luz,A., Turetskaya,R.L., Tarakhovsky,A., Rajewsky,K., Nedospasov,S.A., and Pfeffer,K. (1997). Abnormal development of secondary lymphoid tissues in lymphotoxin beta-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 9302-9307.
- Altman,J.D., Moss,P.A., Goulder,P.J., Barouch,D.H., McHeyzer-Williams,M.G., Bell,J.I., McMichael,A.J., and Davis,M.M. (1996). Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science* 274, 94-96.
- Andreasen,S.O., Christensen,J.E., Marker,O., and Thomsen,A.R. (2000). Role of CD40 ligand and CD28 in induction and maintenance of antiviral CD8+ effector T cell responses. *J. Immunol.* 164, 3689-3697.
- Ansel,K.M., Ngo,V.N., Hyman,P.L., Luther,S.A., Forster,R., Sedgwick,J.D., Browning,J.L., Lipp,M., and Cyster,J.G. (2000). A chemokine-driven positive feedback loop organizes lymphoid follicles. *Nature* 406, 309-314.
- Ashkenazi,A. and Dixit,V.M. (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281, 1305-1308.

Bachmann,M.F., Kalinke,U., Althage,A., Freer,G., Burkhart,C., Roost,H., Aguet,M., Hengartner,H., and Zinkernagel,R.M. (1997). The role of antibody concentration and avidity in antiviral protection. *Science* 276, 2024-2027.

Bachmann,M.F., Zinkernagel,R.M., and Oxenius,A. (1998). Immune responses in the absence of costimulation: viruses know the trick. *J. Immunol.* 161, 5791-5794.

Bai,C., Connolly,B., Metzker,M.L., Hilliard,C.A., Liu,X., Sandig,V., Soderman,A., Galloway,S.M., Liu,Q., Austin,C.P., and Caskey,C.T. (2000). Overexpression of M68/DcR3 in human gastrointestinal tract tumors independent of gene amplification and its location in a four-gene cluster. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 1230-1235.

Bailey,D.W. (1971). Allelic forms of a gene controlling the female immune response to the male antigen in mice. *Transplantation* 11, 426-428.

Bailey,D.W. and Hoste,J. (1971). A gene governing the female immune response to the male antigen in mice. *Transplantation* 11, 404-407.

Bailey,R.P. and Weiss,L. (1975). Ontogeny of human fetal lymph nodes. *Am. J. Anat.* 142, 15-27.

Bancroft,G.J., Bosma,M.J., Bosma,G.C., and Unanue,E.R. (1986). Regulation of macrophage Ia expression in mice with severe combined immunodeficiency: induction of Ia expression by a T cell-independent mechanism. *J. Immunol.* 137, 4-9.

Bancroft,G.J., Schreiber,R.D., Bosma,G.C., Bosma,M.J., and Unanue,E.R. (1987). A T cell-independent mechanism of macrophage activation by interferon-gamma. *J. Immunol.* 139, 1104-1107.

Banks,T.A., Rouse,B.T., Kerley,M.K., Blair,P.J., Godfrey,V.L., Kuklin,N.A., Bouley,D.M., Thomas,J., Kanangat,S., and Mucenski,M.L. (1995). Lymphotoxin-alpha-deficient mice. Effects on secondary lymphoid organ development and humoral immune responsiveness. *J. Immunol.* 155, 1685-1693.

Barnden,M.J., Allison,J., Heath,W.R., and Carbone,F.R. (1998). Defective TCR expression in transgenic mice constructed using cDNA-based alpha- and beta-chain genes under the control of heterologous regulatory elements. *Immunol. Cell Biol.* 76, 34-40.

Batten,M., Groom,J., Cachero,T.G., Qian,F., Schneider,P., Tschopp,J., Browning,J.L., and Mackay,F. (2000). BAFF mediates survival of peripheral immature B lymphocytes. *J. Exp. Med.* 192, 1453-1466.

Beutler,B. and Cerami,A. (1986). Cachectin and tumour necrosis factor as two sides of the same biological coin. *Nature* 320, 584-588.

Bhardwaj,V., Kanagawa,O., Swanson,P.E., and Unanue,E.R. (1998). Chronic Listeria infection in SCID mice: requirements for the carrier state and the dual role of T cells in transferring protection or suppression. *J. Immunol.* 160, 376-384.

- Birnboim,H.C. and Doly,J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7, 1513-1523.
- Black,R.A., Rauch,C.T., Kozlosky,C.J., Peschon,J.J., Slack,J.L., Wolfson,M.F., Castner,B.J., Stocking,K.L., Reddy,P., Srinivasan,S., Nelson,N., Boiani,N., Schooley,K.A., Gerhart,M., Davis,R., Fitzner,J.N., Johnson,R.S., Paxton,R.J., March,C.J., and Cerretti,D.P. (1997). A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature* 385, 729-733.
- Browning,J.L., Dougas,I., Ngam-ek,A., Bourdon,P.R., Ehrenfels,B.N., Miatkowski,K., Zafari,M., Yampaglia,A.M., Lawton,P., Meier,W., and . (1995). Characterization of surface lymphotoxin forms. Use of specific monoclonal antibodies and soluble receptors. *J. Immunol.* 154, 33-46.
- Browning,J.L., Ngam-ek,A., Lawton,P., DeMarinis,J., Tizard,R., Chow,E.P., Hession,C., O'Brine-Greco,B., Foley,S.F., and Ware,C.F. (1993). Lymphotoxin beta, a novel member of the TNF family that forms a heteromeric complex with lymphotoxin on the cell surface. *Cell* 72, 847-856.
- Browning,J.L., Sizing,I.D., Lawton,P., Bourdon,P.R., Rennert,P.D., Majeau,G.R., Ambrose,C.M., Hession,C., Miatkowski,K., Griffiths,D.A., Ngam-ek,A., Meier,W., Benjamin,C.D., and Hochman,P.S. (1997). Characterization of lymphotoxin-alpha beta complexes on the surface of mouse lymphocytes. *J. Immunol.* 159, 3288-3298.
- Busch,D.H., Kerksiek,K., and Pamer,E.G. (1999). Processing of *Listeria monocytogenes* antigens and the in vivo T-cell response to bacterial infection. *Immunol. Rev.* 172, 163-169.
- Busch,D.H., Pilip,I.M., Vijn,S., and Pamer,E.G. (1998). Coordinate regulation of complex T cell populations responding to bacterial infection. *Immunity.* 8, 353-362.
- Calderhead,D.M., Buhlmann,J.E., van den Eertwegh,A.J., Claassen,E., Noelle,R.J., and Fell,H.P. (1993). Cloning of mouse Ox40: a T cell activation marker that may mediate T-B cell interactions. *J. Immunol.* 151, 5261-5271.
- Cannons,J.L., Lau,P., Ghumman,B., DeBenedette,M.A., Yagita,H., Okumura,K., and Watts,T.H. (2001). 4-1Bb ligand induces cell division, sustains survival, and enhances effector function of cd4 and cd8 t cells with similar efficacy. *J. Immunol.* 167, 1313-1324.
- Carswell,E.A., Old,L.J., Kassel,R.L., Green,S., Fiore,N., and Williamson,B. (1975). An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 72, 3666-3670.
- Chambers,C.A. and Allison,J.P. (1997). Co-stimulation in T cell responses. *Curr. Opin. Immunol.* 9, 396-404.
- Chen,M.C., Hsu,T.L., Luh,T.Y., and Hsieh,S.L. (2000). Overexpression of bcl-2 enhances L. *J. Biol. Chem.* 275, 38794-38801.

- Chomczynski,P. and Sacchi,N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* *162*, 156-159.
- Chu,N.R., DeBenedette,M.A., Stiernholm,B.J., Barber,B.H., and Watts,T.H. (1997). Role of IL-12 and 4-1BB ligand in cytokine production by CD28+ and. *J. Immunol.* *158*, 3081-3089.
- Cohen,S.N., Chang,A.C., and Hsu,L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *69*, 2110-2114.
- Crocker,P.R. and Gordon,S. (1986). Properties and distribution of a lectin-like hemagglutinin differentially expressed by murine stromal tissue macrophages. *J. Exp. Med.* *164*, 1862-1875.
- Crowe,P.D., VanArsdale,T.L., Walter,B.N., Ware,C.F., Hession,C., Ehrenfels,B., Browning,J.L., Din,W.S., Goodwin,R.G., and Smith,C.A. (1994). A lymphotoxin-beta-specific receptor. *Science* *264*, 707-710.
- Davies,J.D., Leong,L.Y., Mellor,A., Cobbold,S.P., and Waldmann,H. (1996). T cell suppression in transplantation tolerance through linked recognition. *J. Immunol.* *156*, 3602-3607.
- De Togni,P., Goellner,J., Ruddle,N.H., Streeter,P.R., Fick,A., Mariathasan,S., Smith,S.C., Carlson,R., Shornick,L.P., Strauss-Schoenberger,J., and . (1994). Abnormal development of peripheral lymphoid organs in mice deficient in lymphotoxin. *Science* *264*, 703-707.
- DeBenedette,M.A., Chu,N.R., Pollok,K.E., Hurtado,J., Wade,W.F., Kwon,B.S., and Watts,T.H. (1995). Role of 4-1BB ligand in costimulation of T lymphocyte growth and its upregulation on M12 B lymphomas by cAMP. *J. Exp. Med.* *181*, 985-992.
- DeBenedette,M.A., Shahinian,A., Mak,T.W., and Watts,T.H. (1997). Costimulation of. *J. Immunol.* *158*, 551-559.
- DeBenedette,M.A., Wen,T., Bachmann,M.F., Ohashi,P.S., Barber,B.H., Stocking,K.L., Peschon,J.J., and Watts,T.H. (1999). Analysis of 4-1BB ligand (4-1BBL)-deficient mice and of mice lacking both 4-1BBL and CD28 reveals a role for 4-1BBL in skin allograft rejection and in the cytotoxic T cell response to influenza virus. *J. Immunol.* *163*, 4833-4841.
- Dunham,I., Sargent,C.A., Trowsdale,J., and Campbell,R.D. (1987). Molecular mapping of the human major histocompatibility complex by pulsed-field gel electrophoresis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *84*, 7237-7241.
- Eikelenboom,P., Nassy,J.J., Post,J., Versteeg,J.C., and Langevoort,H.L. (1978). The histogenesis of lymph nodes in rat and rabbit. *Anat. Rec.* *190*, 201-215.
- Enriquez-Harris,P., Levitt,N., Briggs,D., and Proudfoot,N.J. (1991). A pause site for RNA polymerase II is associated with termination of transcription. *EMBO J.* *10*, 1833-1842.

- Erickson,S.L., de Sauvage,F.J., Kikly,K., Carver-Moore,K., Pitts-Meek,S., Gillett,N., Sheehan,K.C., Schreiber,R.D., Goeddel,D.V., and Moore,M.W. (1994). Decreased sensitivity to tumour-necrosis factor but normal T-cell development in TNF receptor-2-deficient mice. *Nature* 372, 560-563.
- Ettinger,R., Browning,J.L., Michie,S.A., van Ewijk,W., and McDevitt,H.O. (1996). Disrupted splenic architecture, but normal lymph node development in mice expressing a soluble lymphotoxin-beta receptor-IgG1 fusion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 13102-13107.
- Ettinger,R., Mebius,R., Browning,J.L., Michie,S.A., van Tuijl,S., Kraal,G., van Ewijk,W., and McDevitt,H.O. (1998). Effects of tumor necrosis factor and lymphotoxin on peripheral lymphoid tissue development. *Int. Immunol.* 10, 727-741.
- Eugster,H.P., Muller,M., Karrer,U., Car,B.D., Schnyder,B., Eng,V.M., Woerly,G., Le Hir,M., di Padova,F., Aguet,M., Zinkernagel,R., Bluethmann,H., and Ryffel,B. (1996). Multiple immune abnormalities in tumor necrosis factor and lymphotoxin-alpha double-deficient mice. *Int. Immunol.* 8, 23-36.
- Fehr,T., Bachmann,M.F., Bluethmann,H., Kikutani,H., Hengartner,H., and Zinkernagel,R.M. (1996). T-independent activation of B cells by vesicular stomatitis virus: no evidence for the need of a second signal. *Cell Immunol.* 168, 184-192.
- Feinberg,A.P. and Vogelstein,B. (1984). "A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity". *Addendum. Anal. Biochem.* 137, 266-267.
- Flajnik,M.F. and Kasahara,M. (2001). Comparative genomics of the MHC: glimpses into the evolution of the adaptive immune system. *Immunity.* 15, 351-362.
- Fu,Y.X. and Chaplin,D.D. (1999). Development and maturation of secondary lymphoid tissues. *Annu. Rev. Immunol.* 17, 399-433.
- Fu,Y.X., Molina,H., Matsumoto,M., Huang,G., Min,J., and Chaplin,D.D. (1997). Lymphotoxin-alpha (LTalpha) supports development of splenic follicular structure that is required for IgG responses. *J. Exp. Med.* 185, 2111-2120.
- Futterer,A., Mink,K., Luz,A., Kosco-Vilbois,M.H., and Pfeffer,K. (1998). The lymphotoxin beta receptor controls organogenesis and affinity maturation in peripheral lymphoid tissues. *Immunity.* 9, 59-70.
- Gowans,J.L. and Knight,E.J. (1964). The route of recirculation of lymphocytes in rat. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B.* 159, 257-282.
- Gramaglia,I., Cooper,D., Miner,K.T., Kwon,B.S., and Croft,M. (2000a). Co-stimulation of antigen-specific CD4 T cells by 4-1BB ligand. *Eur. J. Immunol.* 30, 392-402.

Gramaglia, I., Jember, A., Pippig, S.D., Weinberg, A.D., Killeen, N., and Croft, M. (2000b). The OX40 costimulatory receptor determines the development of CD4 memory by regulating primary clonal expansion. *J. Immunol.* *165*, 3043-3050.

Gramaglia, I., Weinberg, A.D., Lemon, M., and Croft, M. (1998). Ox-40 ligand: a potent costimulatory molecule for sustaining primary CD4 T cell responses. *J. Immunol.* *161*, 6510-6517.

Granger, G.A., Shacks, S.J., Williams, T.W., and Kolb, W.P. (1969). Lymphocyte in vitro cytotoxicity: specific release of lymphotoxin-like materials from tuberculin-sensitive lymphoid cells. *Nature* *221*, 1155-1157.

Granger, S.W., Butrovich, K.D., Houshmand, P., Edwards, W.R., and Ware, C.F. (2001). Genomic Characterization of LIGHT Reveals Linkage to an Immune Response Locus on Chromosome 19p13.3 and Distinct Isoforms Generated by Alternate Splicing or Proteolysis. *J. Immunol.* *167*, 5122-5128.

Granger, S.W. and Ware, C.F. (2001). Turning on LIGHT. *J. Clin. Invest* *108*, 1741-1742.

Gravestain, L.A., Nieland, J.D., Kruisbeek, A.M., and Borst, J. (1995). Novel mAbs reveal potent costimulatory activity of murine CD27. *Int. Immunol.* *7*, 551-557.

Gray, P.W., Aggarwal, B.B., Benton, C.V., Bringman, T.S., Henzel, W.J., Jarrett, J.A., Leung, D.W., Moffat, B., Ng, P., Svedersky, L.P., and . (1984). Cloning and expression of cDNA for human lymphotoxin, a lymphokine with tumour necrosis activity. *Nature* *312*, 721-724.

Green, D.R. (1998). Apoptosis. Death deceiver. *Nature* *396*, 629-630.

Guinn, B.A., DeBenedette, M.A., Watts, T.H., and Berinstein, N.L. (1999). 4-1BBL cooperates with B7-1 and B7-2 in converting a B cell lymphoma cell line into a long-lasting antitumor vaccine. *J. Immunol.* *162*, 5003-5010.

Hamann, D., Baars, P.A., Rep, M.H., Hooibrink, B., Kerkhof-Garde, S.R., Klein, M.R., and van Lier, R.A. (1997). Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8+ T cells. *J. Exp. Med.* *186*, 1407-1418.

Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* *166*, 557-580.

Harrop, J.A., McDonnell, P.C., Brigham-Burke, M., Lyn, S.D., Minton, J., Tan, K.B., Dede, K., Spanpanato, J., Silverman, C., Hensley, P., DiPrinzio, R., Emery, J.G., Deen, K., Eichman, C., Chabot-Fletcher, M., Truneh, A., and Young, P.R. (1998a). Herpesvirus entry mediator ligand (HVEM-L), a novel ligand for HVEM/TR2, stimulates proliferation of T cells and inhibits HT29 cell growth. *J. Biol. Chem.* *273*, 27548-27556.

- Harrop,J.A., Reddy,M., Dede,K., Brigham-Burke,M., Lyn,S., Tan,K.B., Silverman,C., Eichman,C., DiPrinzio,R., Spampinato,J., Porter,T., Holmes,S., Young,P.R., and Truneh,A. (1998b). Antibodies to TR2 (herpesvirus entry mediator), a new member of the TNF receptor superfamily, block T cell proliferation, expression of activation markers, and production of cytokines. *J. Immunol.* *161*, 1786-1794.
- Hendriks,J., Gravestein,L.A., Tesselaar,K., van Lier,R.A., Schumacher,T.N., and Borst,J. (2000). CD27 is required for generation and long-term maintenance of T cell immunity. *Nat. Immunol.* *1*, 433-440.
- Higgins,L.M., McDonald,S.A., Whittle,N., Crockett,N., Shields,J.G., and MacDonald,T.T. (1999). Regulation of T cell activation in vitro and in vivo by targeting the OX40-OX40 ligand interaction: amelioration of ongoing inflammatory bowel disease with an OX40-IgG fusion protein, but not with an OX40 ligand-IgG fusion protein. *J. Immunol.* *162*, 486-493.
- Hintzen,R.Q., de Jong,R., Lens,S.M., and van Lier,R.A. (1994a). CD27: marker and mediator of T-cell activation? *Immunol. Today* *15*, 307-311.
- Hintzen,R.Q., Lens,S.M., Koopman,G., Pals,S.T., Spits,H., and van Lier,R.A. (1994b). CD70 represents the human ligand for CD27. *Int. Immunol.* *6*, 477-480.
- Honda,K., Nakano,H., Yoshida,H., Nishikawa,S., Rennert,P., Ikuta,K., Tamechika,M., Yamaguchi,K., Fukumoto,T., Chiba,T., and Nishikawa,S.I. (2001). Molecular basis for hematopoietic/mesenchymal interaction during initiation of Peyer's patch organogenesis. *J. Exp. Med.* *193*, 621-630.
- Hsu,H., Solovyev,I., Colombero,A., Elliott,R., Kelley,M., and Boyle,W.J. (1997). ATAR, a novel tumor necrosis factor receptor family member, signals through TRAF2 and TRAF5. *J. Biol. Chem.* *272*, 13471-13474.
- Hu,F.Q., Smith,C.A., and Pickup,D.J. (1994). Cowpox virus contains two copies of an early gene encoding a soluble secreted form of the type II TNF receptor. *Virology* *204*, 343-356.
- Hughes,A.L. (1994). Phylogeny of the C3/C4/C5 complement-component gene family indicates that C5 diverged first. *Mol. Biol. Evol.* *11*, 417-425.
- Hurtado,J.C., Kim,S.H., Pollok,K.E., Lee,Z.H., and Kwon,B.S. (1995). Potential role of 4-1BB in T cell activation. Comparison with the costimulatory molecule CD28. *J. Immunol.* *155*, 3360-3367.
- Hurtado,J.C., Kim,Y.J., and Kwon,B.S. (1997). Signals through 4-1BB are costimulatory to previously activated splenic T cells and inhibit activation-induced cell death. *J. Immunol.* *158*, 2600-2609.
- Hurwitz,A.A., Kwon,E.D., and van Elsas,A. (2000). Costimulatory wars: the tumor menace. *Curr. Opin. Immunol.* *12*, 589-596.

Inaba,K., Inaba,M., Romani,N., Aya,H., Deguchi,M., Ikehara,S., Muramatsu,S., and Steinman,R.M. (1992). Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J. Exp. Med.* 176, 1693-1702.

Isakov,N., Yankelevich,B., Segal,S., and Feldman,M. (1979). Differential immunogenic expression of an H-2-linked histocompatibility antigen on different tissues. Differences in survival between heart, thyroid, and skin allografts. *Transplantation* 28, 31-35.

Karasuyama,H. and Melchers,F. (1988). Establishment of mouse cell lines which constitutively secrete large quantities of interleukin 2, 3, 4 or 5, using modified cDNA expression vectors. *Eur. J. Immunol.* 18, 97-104.

Kasahara,M. (1999). The chromosomal duplication model of the major histocompatibility complex. *Immunol. Rev.* 167, 17-32.

Kaufmann,S.H. (1993). Immunity to intracellular bacteria. *Annu. Rev. Immunol.* 11, 129-163.

Kawai,K., Shahinian,A., Mak,T.W., and Ohashi,P.S. (1996). Skin allograft rejection in CD28-deficient mice. *Transplantation* 61, 352-355.

Kelly,K.A. and Scollay,R. (1992). Seeding of neonatal lymph nodes by T cells and identification of a novel population of CD3-CD4+ cells. *Eur. J. Immunol.* 22, 329-334.

Kim,Y.J., Kim,S.H., Mantel,P., and Kwon,B.S. (1998). Human 4-1BB regulates CD28 co-stimulation to promote Th1 cell responses. *Eur. J. Immunol.* 28, 881-890.

Kong,Y.Y., Yoshida,H., Sarosi,I., Tan,H.L., Timms,E., Capparelli,C., Morony,S., Oliveira-dos-Santos,A.J., Van,G., Itie,A., Khoo,W., Wakeham,A., Dunstan,C.R., Lacey,D.L., Mak,T.W., Boyle,W.J., and Penninger,J.M. (1999). OPG is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* 397, 315-323.

Koni,P.A. and Flavell,R.A. (1998). A role for tumor necrosis factor receptor type 1 in gut-associated lymphoid tissue development: genetic evidence of synergism with lymphotoxin beta. *J. Exp. Med.* 187, 1977-1983.

Koni,P.A., Sacca,R., Lawton,P., Browning,J.L., Ruddle,N.H., and Flavell,R.A. (1997). Distinct roles in lymphoid organogenesis for lymphotoxins alpha and beta revealed in lymphotoxin beta-deficient mice. *Immunity.* 6, 491-500.

Kopf,M., Ruedl,C., Schmitz,N., Gallimore,A., Lefrang,K., Ecabert,B., Odermatt,B., and Bachmann,M.F. (1999). OX40-deficient mice are defective in Th cell proliferation but are competent in generating B cell and CTL Responses after virus infection. *Immunity.* 11, 699-708.

- Korner,H., Cook,M., Riminton,D.S., Lemckert,F.A., Hoek,R.M., Ledermann,B., Kontgen,F., Fazekas de St.G.B., and Sedgwick,J.D. (1997). Distinct roles for lymphotoxin-alpha and tumor necrosis factor in organogenesis and spatial organization of lymphoid tissue. *Eur. J. Immunol.* 27, 2600-2609.
- Kosco-Vilbois,M.H., Zentgraf,H., Gerdes,J., and Bonnefoy,J.Y. (1997). To 'B' or not to 'B' a germinal center? *Immunol. Today* 18, 225-230.
- Kraal,G. and Mebius,R.E. (1997). High endothelial venules: lymphocyte traffic control and controlled traffic. *Adv. Immunol.* 65, 347-395.
- Kundig,T.M., Shahinian,A., Kawai,K., Mittrucker,H.W., Sebзда,E., Bachmann,M.F., Mak,T.W., and Ohashi,P.S. (1996). Duration of TCR stimulation determines costimulatory requirement of T cells. *Immunity.* 5, 41-52.
- Kuprash,D.V., Alimzhanov,M.B., Tumanov,A.V., Anderson,A.O., Pfeffer,K., and Nedospasov,S.A. (1999). TNF and lymphotoxin beta cooperate in the maintenance of secondary lymphoid tissue microarchitecture but not in the development of lymph nodes. *J. Immunol.* 163, 6575-6580.
- Kurts,C., Heath,W.R., Carbone,F.R., Allison,J., Miller,J.F., and Kosaka,H. (1996). Constitutive class I-restricted exogenous presentation of self antigens in vivo. *J. Exp. Med.* 184, 923-930.
- Kwon,B., Youn,B.S., and Kwon,B.S. (1999a). Functions of newly identified members of the tumor necrosis factor receptor/ligand superfamilies in lymphocytes. *Curr. Opin. Immunol.* 11, 340-345.
- Kwon,B., Yu,K.Y., Ni,J., Yu,G.L., Jang,I.K., Kim,Y.J., Xing,L., Liu,D., Wang,S.X., and Kwon,B.S. (1999b). Identification of a novel activation-inducible protein of the tumor necrosis factor receptor superfamily and its ligand. *J. Biol. Chem.* 274, 6056-6061.
- Kwon,B.S., Tan,K.B., Ni,J., Oh,K.O., Lee,Z.H., Kim,K.K., Kim,Y.J., Wang,S., Gentz,R., Yu,G.L., Harrop,J., Lyn,S.D., Silverman,C., Porter,T.G., Truneh,A., and Young,P.R. (1997). A newly identified member of the tumor necrosis factor receptor superfamily with a wide tissue distribution and involvement in lymphocyte activation. *J. Biol. Chem.* 272, 14272-14276.
- Ladel,C.H., Flesch,I.E., Arnoldi,J., and Kaufmann,S.H. (1994). Studies with MHC-deficient knock-out mice reveal impact of both M. *J. Immunol.* 153, 3116-3122.
- Lane,P. (2000). Role of OX40 signals in coordinating CD4 T cell selection, migration, and cytokine differentiation in T helper (Th)1 and Th2 cells. *J. Exp. Med.* 191, 201-206.
- Larsen,C.P., Elwood,E.T., Alexander,D.Z., Ritchie,S.C., Hendrix,R., Tucker-Burden,C., Cho,H.R., Aruffo,A., Hollenbaugh,D., Linsley,P.S., Winn,K.J., and Pearson,T.C. (1996). Long-term acceptance of skin and cardiac allografts after blocking CD40 and CD28 pathways. *Nature* 381, 434-438.

Le Hir, M., Bluethmann, H., Kosco-Vilbois, M.H., Muller, M., di Padova, F., Moore, M., Ryffel, B., and Eugster, H.P. (1996). Differentiation of follicular dendritic cells and full antibody responses require tumor necrosis factor receptor-1 signaling. *J. Exp. Med.* 183, 2367-2372.

Lefrancois, L. (1984). Protection against lethal viral infection by neutralizing and nonneutralizing monoclonal antibodies: distinct mechanisms of action in vivo. *J. Virol.* 51, 208-214.

Lehrach, H., Diamond, D., Wozney, J.M., and Boedtker, H. (1977). RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochemistry* 16, 4743-4751.

Leist, T.P., Cobbold, S.P., Waldmann, H., Aguet, M., and Zinkernagel, R.M. (1987). Functional analysis of T lymphocyte subsets in antiviral host defense. *J. Immunol.* 138, 2278-2281.

Lens, S.M., Tesselaar, K., van Oers, M.H., and van Lier, R.A. (1998). Control of lymphocyte function through CD27-CD70 interactions. *Semin. Immunol.* 10, 491-499.

Lenschow, D.J., Walunas, T.L., and Bluestone, J.A. (1996). CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu. Rev. Immunol.* 14, 233-258.

Lewis, E.B. (1978). A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* 276, 565-570.

Lewis, M., Tartaglia, L.A., Lee, A., Bennett, G.L., Rice, G.C., Wong, G.H., Chen, E.Y., and Goeddel, D.V. (1991). Cloning and expression of cDNAs for two distinct murine tumor necrosis factor receptors demonstrate one receptor is species specific. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 88, 2830-2834.

Li, Y., Li, X.C., Zheng, X.X., Wells, A.D., Turka, L.A., and Strom, T.B. (1999). Blocking both signal 1 and signal 2 of T-cell activation prevents apoptosis of alloreactive T cells and induction of peripheral allograft tolerance. *Nat. Med.* 5, 1298-1302.

Liu, Y., Wenger, R.H., Zhao, M., and Nielsen, P.J. (1997). Distinct costimulatory molecules are required for the induction of effector and memory cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 185, 251-262.

Liu, Y.J. and Banchereau, J. (1997). Regulation of B-cell commitment to plasma cells or to memory B cells. *Semin. Immunol.* 9, 235-240.

Locksley, R.M., Killeen, N., and Lenardo, M.J. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104, 487-501.

Loetscher, H., Pan, Y.C., Lahm, H.W., Gentz, R., Brockhaus, M., Tabuchi, H., and Lesslauer, W. (1990). Molecular cloning and expression of the human 55 kd tumor necrosis factor receptor. *Cell* 61, 351-359.

Loparev, V.N., Parsons, J.M., Knight, J.C., Panus, J.F., Ray, C.A., Buller, R.M., Pickup, D.J., and Esposito, J.J. (1998). A third distinct tumor necrosis factor receptor of orthopoxviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 3786-3791.

- Lopez-Macias,C., Kalinke,U., Cascalho,M., Wabl,M., Hengartner,H., Zinkernagel,R.M., and Lamarre,A. (1999). Secondary rearrangements and hypermutation generate sufficient B cell diversity to mount protective antiviral immunoglobulin responses. *J. Exp. Med.* 189, 1791-1798.
- Lumsden,J.M., Roberts,J.M., Harris,N.L., Peach,R.J., and Ronchese,F. (2000). Differential requirement for CD80 and CD80/CD86-dependent costimulation in the lung immune response to an influenza virus infection. *J. Immunol.* 164, 79-85.
- Lynch,D.H., Watson,M.L., Alderson,M.R., Baum,P.R., Miller,R.E., Tough,T., Gibson,M., Davis-Smith,T., Smith,C.A., Hunter,K., and . (1994). The mouse Fas-ligand gene is mutated in *gld* mice and is part of a TNF family gene cluster. *Immunity.* 1, 131-136.
- Mackay,F. and Browning,J.L. (1998). Turning off follicular dendritic cells. *Nature* 395, 26-27.
- Mackay,F., Majeau,G.R., Lawton,P., Hochman,P.S., and Browning,J.L. (1997). Lymphotoxin but not tumor necrosis factor functions to maintain splenic architecture and humoral responsiveness in adult mice. *Eur. J. Immunol.* 27, 2033-2042.
- Macpherson,I. and Stoker,M. (1962). Polyoma transformation of hamster cell clones: An investigation of genetic factors affecting cell competence. *Virology* 16, 147-151.
- Maier,S., Tertilt,C., Chambron,N., Gerauer,K., Huser,N., Heidecke,C.D., and Pfeffer,K. (2001). Inhibition of natural killer cells results in acceptance of cardiac allografts in CD28^{-/-} mice. *Nat. Med.* 7, 557-562.
- Marino,M.W., Dunn,A., Grail,D., Inglese,M., Noguchi,Y., Richards,E., Jungbluth,A., Wada,H., Moore,M., Williamson,B., Basu,S., and Old,L.J. (1997). Characterization of tumor necrosis factor-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 8093-8098.
- Matsumoto,M., Lo,S.F., Carruthers,C.J., Min,J., Mariathasan,S., Huang,G., Plas,D.R., Martin,S.M., Geha,R.S., Nahm,M.H., and Chaplin,D.D. (1996a). Affinity maturation without germinal centres in lymphotoxin-alpha-deficient mice. *Nature* 382, 462-466.
- Matsumoto,M., Mariathasan,S., Nahm,M.H., Baranyay,F., Peschon,J.J., and Chaplin,D.D. (1996b). Role of lymphotoxin and the type I TNF receptor in the formation of germinal centers. *Science* 271, 1289-1291.
- Mauri,D.N., Ebner,R., Montgomery,R.I., Kochel,K.D., Cheung,T.C., Yu,G.L., Ruben,S., Murphy,M., Eisenberg,R.J., Cohen,G.H., Spear,P.G., and Ware,C.F. (1998). LIGHT, a new member of the TNF superfamily, and lymphotoxin alpha are ligands for herpesvirus entry mediator. *Immunity.* 8, 21-30.
- Maxwell,J.R., Weinberg,A., Prell,R.A., and Vella,A.T. (2000). Danger and OX40 receptor signaling synergize to enhance memory T cell survival by inhibiting peripheral deletion. *J. Immunol.* 164, 107-112.

McAdam,A.J., Gewurz,B.E., Farkash,E.A., and Sharpe,A.H. (2000). Either B7 costimulation or IL-2 can elicit generation of primary alloreactive CTL. *J. Immunol.* 165, 3088-3093.

Mebius,R.E., Rennert,P., and Weissman,I.L. (1997). Developing lymph nodes collect CD4+CD3-LTbeta+ cells that can differentiate to APC, NK cells, and follicular cells but not T or B cells. *Immunity.* 7, 493-504.

Mebius,R.E., Streeter,P.R., Michie,S., Butcher,E.C., and Weissman,I.L. (1996). A developmental switch in lymphocyte homing receptor and endothelial vascular addressin expression regulates lymphocyte homing and permits CD4+ CD3- cells to colonize lymph nodes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 11019-11024.

Melero,I., Bach,N., Hellstrom,K.E., Aruffo,A., Mittler,R.S., and Chen,L. (1998). Amplification of tumor immunity by gene transfer of the co-stimulatory 4-1BB ligand: synergy with the CD28 co-stimulatory pathway. *Eur. J. Immunol.* 28, 1116-1121.

Misawa,K., Nosaka,T., Kojima,T., Hirai,M., and Kitamura,T. (2000). Molecular cloning and characterization of a mouse homolog of human TNFSF14, a member of the TNF superfamily. *Cytogenet. Cell Genet.* 89, 89-91.

Mittrucker,H.W., Kohler,A., and Kaufmann,S.H. (2000). Substantial in vivo proliferation of CD4(+) and CD8(+) T lymphocytes during secondary *Listeria monocytogenes* infection. *Eur. J. Immunol.* 30, 1053-1059.

Montgomery,R.I., Warner,M.S., Lum,B.J., and Spear,P.G. (1996). Herpes simplex virus-1 entry into cells mediated by a novel member of the TNF/NGF receptor family. *Cell* 87, 427-436.

Morel,Y., Schiano de Colella,J.M., Harrop,J., Deen,K.C., Holmes,S.D., Wattam,T.A., Khandekar,S.S., Truneh,A., Sweet,R.W., Gastaut,J.A., Olive,D., and Costello,R.T. (2000). Reciprocal expression of the TNF family receptor herpes virus entry mediator and its ligand LIGHT on activated T cells: LIGHT down-regulates its own receptor. *J. Immunol.* 165, 4397-4404.

Morel,Y., Truneh,A., Sweet,R.W., Olive,D., and Costello,R.T. (2001). The TNF Superfamily Members LIGHT and CD154 (CD40 Ligand) Costimulate Induction of Dendritic Cell Maturation and Elicit Specific CTL Activity. *J. Immunol.* 167, 2479-2486.

Mullis,K.B. and Faloona,F.A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155, 335-350.

Murata,K., Ishii,N., Takano,H., Miura,S., Ndhlovu,L.C., Nose,M., Noda,T., and Sugamura,K. (2000). Impairment of antigen-presenting cell function in mice lacking expression of OX40 ligand. *J. Exp. Med.* 191, 365-374.

- Murphy, K.M., Heimberger, A.B., and Loh, D.Y. (1990). Induction by antigen of intrathymic apoptosis of CD4+CD8+TCR α thymocytes in vivo. *Science* 250, 1720-1723.
- Neubauer, H., Cumano, A., Muller, M., Wu, H., Huffstadt, U., and Pfeffer, K. (1998). Jak2 deficiency defines an essential developmental checkpoint in definitive hematopoiesis. *Cell* 93, 397-409.
- Neumann, B., Luz, A., Pfeffer, K., and Holzmann, B. (1996). Defective Peyer's patch organogenesis in mice lacking the 55-kD receptor for tumor necrosis factor. *J. Exp. Med.* 184, 259-264.
- Nishikawa, S.I., Hashi, H., Honda, K., Fraser, S., and Yoshida, H. (2000). Inflammation, a prototype for organogenesis of the lymphopoietic/hematopoietic system. *Curr. Opin. Immunol.* 12, 342-345.
- Oshima, H., Nakano, H., Nohara, C., Kobata, T., Nakajima, A., Jenkins, N.A., Gilbert, D.J., Copeland, N.G., Muto, T., Yagita, H., and Okumura, K. (1998). Characterization of murine CD70 by molecular cloning and mAb. *Int. Immunol.* 10, 517-526.
- Parganas, E., Wang, D., Stravopodis, D., Topham, D.J., Marine, J.C., Teglund, S., Vanin, E.F., Bodner, S., Colamonici, O.R., van Deursen, J.M., Grosveld, G., and Ihle, J.N. (1998). Jak2 is essential for signaling through a variety of cytokine receptors. *Cell* 93, 385-395.
- Pasparakis, M., Alexopoulou, L., Episkopou, V., and Kollias, G. (1996). Immune and inflammatory responses in TNF alpha-deficient mice: a critical requirement for TNF alpha in the formation of primary B cell follicles, follicular dendritic cell networks and germinal centers, and in the maturation of the humoral immune response. *J. Exp. Med.* 184, 1397-1411.
- Pasparakis, M., Kousteni, S., Peschon, J., and Kollias, G. (2000). Tumor necrosis factor and the p55TNF receptor are required for optimal development of the marginal sinus and for migration of follicular dendritic cell precursors into splenic follicles. *Cell Immunol.* 201, 33-41.
- Paul, N.L. and Ruddle, N.H. (1988). Lymphotoxin. *Annu. Rev. Immunol.* 6, 407-438.
- Pekala, P.H., Kawakami, M., Angus, C.W., Lane, M.D., and Cerami, A. (1983). Selective inhibition of synthesis of enzymes for de novo fatty acid biosynthesis by an endotoxin-induced mediator from exudate cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 80, 2743-2747.
- Pennica, D., Nedwin, G.E., Hayflick, J.S., Seeburg, P.H., Derynck, R., Palladino, M.A., Kohr, W.J., Aggarwal, B.B., and Goeddel, D.V. (1984). Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature* 312, 724-729.
- Pfeffer, K., Matsuyama, T., Kundig, T.M., Wakeham, A., Kishihara, K., Shahinian, A., Wiegmann, K., Ohashi, P.S., Kronke, M., and Mak, T.W. (1993). Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to *L. monocytogenes* infection. *Cell* 73, 457-467.

Pippig,S.D., Pena-Rossi,C., Long,J., Godfrey,W.R., Fowell,D.J., Reiner,S.L., Birkeland,M.L., Locksley,R.M., Barclay,A.N., and Killeen,N. (1999). Robust B cell immunity but impaired T cell proliferation in the absence of CD134 (OX40). *J. Immunol.* 163, 6520-6529.

Pitti,R.M., Marsters,S.A., Lawrence,D.A., Roy,M., Kischkel,F.C., Dowd,P., Huang,A., Donahue,C.J., Sherwood,S.W., Baldwin,D.T., Godowski,P.J., Wood,W.I., Gurney,A.L., Hillan,K.J., Cohen,R.L., Goddard,A.D., Botstein,D., and Ashkenazi,A. (1998). Genomic amplification of a decoy receptor for Fas ligand in lung and colon cancer. *Nature* 396, 699-703.

Puck,T.T. (1958). Genetics of somatic mammalian cells III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. *J. Exp. Med.* 108, 945-956.

Rajewsky,K., Gu,H., Kuhn,R., Betz,U.A., Muller,W., Roes,J., and Schwenk,F. (1996). Conditional gene targeting. *J. Clin. Invest* 98, 600-603.

Rennert,P.D., Browning,J.L., and Hochman,P.S. (1997). Selective disruption of lymphotoxin ligands reveals a novel set of mucosal lymph nodes and unique effects on lymph node cellular organization. *Int. Immunol.* 9, 1627-1639.

Rennert,P.D., Browning,J.L., Mebius,R., Mackay,F., and Hochman,P.S. (1996). Surface lymphotoxin alpha/beta complex is required for the development of peripheral lymphoid organs. *J. Exp. Med.* 184, 1999-2006.

Rennert,P.D., Hochman,P.S., Flavell,R.A., Chaplin,D.D., Jayaraman,S., Browning,J.L., and Fu,Y.X. (2001). Essential role of lymph nodes in contact hypersensitivity revealed in lymphotoxin-alpha-deficient mice. *J. Exp. Med.* 193, 1227-1238.

Rennert,P.D., James,D., Mackay,F., Browning,J.L., and Hochman,P.S. (1998). Lymph node genesis is induced by signaling through the lymphotoxin beta receptor. *Immunity.* 9, 71-79.

Roberts,C.W., Shutter,J.R., and Korsmeyer,S.J. (1994). Hox11 controls the genesis of the spleen. *Nature* 368, 747-749.

Rogers,P.R. and Croft,M. (2000). CD28, Ox-40, LFA-1, and CD4 modulation of Th1/Th2 differentiation is directly dependent on the dose of antigen. *J. Immunol.* 164, 2955-2963.

Rooney,I.A., Butrovich,K.D., Glass,A.A., Borboroglu,S., Benedict,C.A., Whitbeck,J.C., Cohen,G.H., Eisenberg,R.J., and Ware,C.F. (2000). The lymphotoxin-beta receptor is necessary and sufficient for LIGHT-mediated apoptosis of tumor cells. *J. Biol. Chem.* 275, 14307-14315.

Rothe,J., Lesslauer,W., Lotscher,H., Lang,Y., Koebel,P., Kontgen,F., Althage,A., Zinkernagel,R., Steinmetz,M., and Bluethmann,H. (1993). Mice lacking the tumour necrosis factor receptor 1 are resistant to TNF-mediated toxicity but highly susceptible to infection by *Listeria monocytogenes*. *Nature* 364, 798-802.

- Sabin,F.R. (1902). On the origin of the lymphatic system from the veins and the development of the lymph hearts and thoracic ducts in the pig. *Am. J. Anat.* 1, 367-389.
- Sabin,F.R. (1909). The lymphatic system in human embryos, with a consideration of the morphology of the system as a whole. *Am. J. Anat.* 9, 43-91.
- Sacca,R., Cuff,C.A., and Ruddle,N.H. (1997). Mediators of inflammation. *Curr. Opin. Immunol.* 9, 851-857.
- Salio,M., Cella,M., Suter,M., and Lanzavecchia,A. (1999). Inhibition of dendritic cell maturation by herpes simplex virus. *Eur. J. Immunol.* 29, 3245-3253.
- Schiemann,B., Gommerman,J.L., Vora,K., Cachero,T.G., Shulga-Morskaya,S., Dobles,M., Frew,E., and Scott,M.L. (2001). An essential role for BAFF in the normal development of B cells through a BCMA-independent pathway. *Science* 293, 2111-2114.
- Schreiber,M., Sedger,L., and McFadden,G. (1997). Distinct domains of M-T2, the myxoma virus tumor necrosis factor (TNF) receptor homolog, mediate extracellular TNF binding and intracellular apoptosis inhibition. *J. Virol.* 71, 2171-2181.
- Screaton,G. and Xu,X.N. (2000). T cell life and death signalling via TNF-receptor family members. *Curr. Opin. Immunol.* 12, 316-322.
- Shahinian,A., Pfeffer,K., Lee,K.P., Kundig,T.M., Kishihara,K., Wakeham,A., Kawai,K., Ohashi,P.S., Thompson,C.B., and Mak,T.W. (1993). Differential T cell costimulatory requirements in CD28-deficient mice. *Science* 261, 609-612.
- Shaikh,R.B., Santee,S., Granger,S.W., Butrovich,K., Cheung,T., Kronenberg,M., Cheroutre,H., and Ware,C.F. (2001). Constitutive Expression of LIGHT on T Cells Leads to Lymphocyte Activation, Inflammation, and Tissue Destruction. *J. Immunol.* 167, 6330-6337.
- Sigal,L.J., Reiser,H., and Rock,K.L. (1998). The role of B7-1 and B7-2 costimulation for the generation of CTL responses in vivo. *J. Immunol.* 161, 2740-2745.
- Smith,C.A., Davis,T., Anderson,D., Solam,L., Beckmann,M.P., Jerzy,R., Dower,S.K., Cosman,D., and Goodwin,R.G. (1990). A receptor for tumor necrosis factor defines an unusual family of cellular and viral proteins. *Science* 248, 1019-1023.
- Smith,C.A., Farrah,T., and Goodwin,R.G. (1994). The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell* 76, 959-962.
- Smith,C.A., Hu,F.Q., Smith,T.D., Richards,C.L., Smolak,P., Goodwin,R.G., and Pickup,D.J. (1996). Cowpox virus genome encodes a second soluble homologue of cellular TNF receptors, distinct from CrmB, that binds TNF but not LT alpha. *Virology* 223, 132-147.

Southern,E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98 , 503-517.

Sternberg,N. and Hamilton,D. (1981). Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites. *J. Mol. Biol.* 150, 467-486.

Sternberg,N., Hamilton,D., and Hoess,R. (1981). Bacteriophage P1 site-specific recombination. II. Recombination between loxP and the bacterial chromosome. *J. Mol. Biol.* 150, 487-507.

Sternberg,N., Sauer,B., Hoess,R., and Abremski,K. (1986). Bacteriophage P1 cre gene and its regulatory region. Evidence for multiple promoters and for regulation by DNA methylation. *J. Mol. Biol.* 187, 197-212.

Tamada,K., Shimosaki,K., Chapoval,A.I., Zhai,Y., Su,J., Chen,S.F., Hsieh,S.L., Nagata,S., Ni,J., and Chen,L. (2000a). LIGHT, a TNF-like molecule, costimulates T cell proliferation and is required for dendritic cell-mediated allogeneic T cell response. *J. Immunol.* 164, 4105-4110.

Tamada,K., Shimosaki,K., Chapoval,A.I., Zhu,G., Sica,G., Flies,D., Boone,T., Hsu,H., Fu,Y.X., Nagata,S., Ni,J., and Chen,L. (2000b). Modulation of T-cell-mediated immunity in tumor and graft-versus-host disease models through the LIGHT co-stimulatory pathway. *Nat. Med.* 6, 283-289.

Tan,J.T., Whitmire,J.K., Ahmed,R., Pearson,T.C., and Larsen,C.P. (1999). 4-1BB ligand, a member of the TNF family, is important for the generation of antiviral CD8 T cell responses. *J. Immunol.* 163, 4859-4868.

Tan,J.T., Whitmire,J.K., Murali-Krishna,K., Ahmed,R., Altman,J.D., Mittler,R.S., Sette,A., Pearson,T.C., and Larsen,C.P. (2000). 4-1BB costimulation is required for protective anti-viral immunity after peptide vaccination. *J. Immunol.* 164, 2320-2325.

Tesselaar,K., Gravestien,L.A., van Schijndel,G.M., Borst,J., and van Lier,R.A. (1997). Characterization of murine CD70, the ligand of the TNF receptor family member CD27. *J. Immunol.* 159, 4959-4965.

Thompson,J.S., Bixler,S.A., Qian,F., Vora,K., Scott,M.L., Cachero,T.G., Hession,C., Schneider,P., Sizing,I.D., Mullen,C., Strauch,K., Zafari,M., Benjamin,C.D., Tschopp,J., Browning,J.L., and Ambrose,C. (2001). BAFF-R, a newly identified TNF receptor that specifically interacts with BAFF. *Science* 293, 2108-2111.

Thompson,J.S., Schneider,P., Kalled,S.L., Wang,L., Lefevre,E.A., Cachero,T.G., Mackay,F., Bixler,S.A., Zafari,M., Liu,Z.Y., Woodcock,S.A., Qian,F., Batten,M., Madry,C., Richard,Y., Benjamin,C.D., Browning,J.L., Tsapis,A., Tschopp,J., and Ambrose,C. (2000). BAFF binds to the tumor necrosis factor receptor-like molecule B cell maturation antigen and is important for maintaining the peripheral B cell population. *J. Exp. Med.* 192, 129-135.

- Trambley,J., Bingaman,A.W., Lin,A., Elwood,E.T., Waitze,S.Y., Ha,J., Durham,M.M., Corbascio,M., Cowan,S.R., Pearson,T.C., and Larsen,C.P. (1999). Asialo GM1(+) CD8(+) T cells play a critical role in costimulation blockade-resistant allograft rejection. *J. Clin. Invest* 104, 1715-1722.
- Tsubata,T. (1999). Apoptosis of mature B cells. *Int. Rev. Immunol.* 18, 347-365.
- Unanue,E.R. (1997). Studies in listeriosis show the strong symbiosis between the innate cellular system and the T-cell response. *Immunol. Rev.* 158, 11-25.
- van Lier,R.A., Borst,J., Vroom,T.M., Klein,H., Van Mourik,P., Zeijlemaker,W.P., and Melief,C.J. (1987). Tissue distribution and biochemical and functional properties of Tp55 (CD27), a novel T cell differentiation antigen. *J. Immunol.* 139, 1589-1596.
- Vanderzant,C. and Splittstoesser,D.F. (1996). Compendium of methods for the microbiological examination of foods., C.Vanderzant and D.F.Splittstoesser, eds. (Washington, DC: American Public Health Association), pp. 34-43.
- Vinay,D.S. and Kwon,B.S. (1998). Role of 4-1BB in immune responses. *Semin. Immunol.* 10, 481-489.
- Wagner,R.R. (1987). *The Rhabdoviruses.* (New York: Plenum).
- Wang,J., Chun,T., Lo,J.C., Wu,Q., Wang,Y., Foster,A., Roca,K., Chen,M., Tamada,K., Chen,L., Wang,C.R., and Fu,Y.X. (2001a). The critical role of light, a tnf family member, in t cell development. *J. Immunol.* 167, 5099-5105.
- Wang,J., Lo,J.C., Foster,A., Yu,P., Chen,H.M., Wang,Y., Tamada,K., Chen,L., and Fu,Y.X. (2001b). The regulation of T cell homeostasis and autoimmunity by T cell-derived LIGHT. *J. Clin. Invest* 108, 1771-1780.
- Ware,C.F., VanArsdale,T.L., Crowe,P.D., and Browning,J.L. (1995). The ligands and receptors of the lymphotoxin system. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 198, 175-218.
- Warren,R.P., Lofgreen,J.S., and Steinmuller,D. (1973). Differential survival of heart and skin allografts in inbred rats. *Transplant. Proc.* 5, 717-719.
- Watts,T.H. and DeBenedette,M.A. (1999). T cell co-stimulatory molecules other than CD28. *Curr. Opin. Immunol.* 11, 286-293.
- Weinberg,A.D., Vella,A.T., and Croft,M. (1998). OX-40: life beyond the effector T cell stage. *Semin. Immunol.* 10, 471-480.
- Weinberg,A.D., Wegmann,K.W., Funatake,C., and Whitham,R.H. (1999). Blocking OX-40/OX-40 ligand interaction in vitro and in vivo leads to decreased T cell function and amelioration of experimental allergic encephalomyelitis. *J. Immunol.* 162, 1818-1826.

Wigle, J.T. and Oliver, G. (1999). Prox1 function is required for the development of the murine lymphatic system. *Cell* 98, 769-778.

Wilkinson, M., Doskow, J., and Lindsey, S. (1991). RNA blots: staining procedures and optimization of conditions. *Nucleic Acids Res.* 19, 679.

Wurst, W. and Joyner, A.L. (1993). Production of targeted embryonic stem cell clones. In *Gene Targeting: A Practical Approach*, A.L. Joyner, ed. (Oxford: Oxford University Press), pp. 33-61.

Yokota, Y., Mansouri, A., Mori, S., Sugawara, S., Adachi, S., Nishikawa, S., and Gruss, P. (1999). Development of peripheral lymphoid organs and natural killer cells depends on the helix-loop-helix inhibitor Id2. *Nature* 397, 702-706.

Yoshida, H., Honda, K., Shinkura, R., Adachi, S., Nishikawa, S., Maki, K., Ikuta, K., and Nishikawa, S.I. (1999). IL-7 receptor alpha+ CD3(-) cells in the embryonic intestine induces the organizing center of Peyer's patches. *Int. Immunol.* 11, 643-655.

Yoshida, H., Kawamoto, H., Santee, S.M., Hashi, H., Honda, K., Nishikawa, S., Ware, C.F., Katsura, Y., and Nishikawa, S.I. (2001). Expression of alpha(4)beta(7) integrin defines a distinct pathway of lymphoid progenitors committed to T cells, fetal intestinal lymphotoxin producer, NK, and dendritic cells. *J. Immunol.* 167, 2511-2521.

Yu, K.Y., Kwon, B., Ni, J., Zhai, Y., Ebner, R., and Kwon, B.S. (1999). A newly identified member of tumor necrosis factor receptor superfamily (TR6) suppresses LIGHT-mediated apoptosis. *J. Biol. Chem.* 274, 13733-13736.

Zhai, Y., Guo, R., Hsu, T.L., Yu, G.L., Ni, J., Kwon, B.S., Jiang, G.W., Lu, J., Tan, J., Ugustus, M., Carter, K., Rojas, L., Zhu, F., Lincoln, C., Endress, G., Xing, L., Wang, S., Oh, K.O., Gentz, R., Ruben, S., Lippman, M.E., Hsieh, S.L., and Yang, D. (1998). LIGHT, a novel ligand for lymphotoxin beta receptor and TR2/HVEM induces apoptosis and suppresses in vivo tumor formation via gene transfer. *J. Clin. Invest* 102, 1142-1151.

Zimmermann, C., Seiler, P., Lane, P., and Zinkernagel, R.M. (1997). Antiviral immune responses in CTLA4 transgenic mice. *J. Virol.* 71, 1802-1807.

7 DANKSAGUNG

Zum Schluss möchte ich mich bei all denen bedanken, ohne die diese Arbeit nicht entstanden wäre.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Klaus Pfeffer für die Überlassung des Themas, die exzellente Betreuung und vor allem die kontinuierliche Unterstützung bei gleichzeitiger Gewährung eines grossen Freiraums, der ein erstes eigenständiges wissenschaftliches Arbeiten ermöglichte.

Bei Prof Dr. Dr. h.c. Hermann Wagner möchte ich mich bedanken für die Möglichkeit, am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der Technischen Universität München diese Arbeit anzufertigen.

Herrn Prof. Dr. Alfons Gierl möchte ich danken für die freundliche Betreuung meiner Arbeit von Seiten der Fakultät für Chemie.

Bedanken möchte ich mich bei Dr. Ulrich Kalinke und Winfried Barchet für die Durchführung der viralen Infektionsexperimente.

Bei unserem Tierpflegerteam möchte ich mich bedanken für die Betreuung meiner zahlreichen Mausstämme.

Allen Kollegen, besonders dem Labor Pfeffer möchte ich für ihre stetige Hilfsbereitschaft danken.

Insbesondere gilt mein Dank Karin Mink, Agnes Fütterer und Evelyn Schaller für die ausgezeichnete technische Unterstützung, Jennifer Meinecke und Ulrike Huffstadt für die exzellente Mausearbeit, meinen (Ex-)Doktoranden-Kollegen (in the order of appearance) Dr. Thomas Plitz, Dr. Hans Neubauer, Cornelia Brettl, Dr. Annette Schaub und Christine Tertilt, den Postdocs Dr. Robert Endres und Dr. Heinrich Flaswinkel und der "Next Generation" für zahlreiche Tipps, anregende und unterhaltsame Diskussionen und eine hervorragende Arbeitsatmosphäre.

Bei Thomas Schmalzl, Caroline Mahler und Steffi Förster möchte ich mich bedanken für die große Hilfe beim Genotypisieren.

Bei Tobias Pötzel möchte ich mich bedanken für die konfokale Analyse der Milzarchitektur und die Versorgung mit qualitativ hochwertigen koffeinhaltigen Heissgetränken.

Dr. Judith Alferink möchte ich danken für die große Unterstützung bei zahlreichen zellbiologischen und Tierexperimenten, insbesondere den Hauttransplantationsexperimenten und der Analyse der Dendritischen Zellen.

Mein allergrösster Dank gebührt meinem Vater für jede erdenkliche Unterstützung und das in mich gesetzte Vertrauen.

8 ANHANG: NUKLEOTIDSEQUENZ DES MURINEN GENOMISCHEN LOKUS FÜR LIGHT

Im Rahmen der Arbeit wurde ein 9,9 kb großes Fragment des murinen genomischen Lokus für LIGHT kloniert und sequenziert. In der hier abgedruckten Sequenz sind die Exone I-IV grau unterlegt und das Startkodon, das Stopkodon und das Polyadenylierungssignal umrahmt.

```

      10      20      30      40      50      60
ACTAGTAAGC CACAACCTTT CCTTTCTTGT CATCTCCAAG ATCAAACATT AATATCAACG

      70      80      90     100     110     120
TCACAACATA AAAACATTTT GTGGGCTAGA GAGATGGCTT GGAGGCTAAG AGCACTGGCT

     130     140     150     160     170     180
GTTCTTCAAG AAAATGAGCA ATTCCCAGCA CCCACACGGC AGCTCACAAC TGTCTTTAAT

     190     200     210     220     230     240
TCATTTTCCA GGGGATCCAA ATCCCTCACA CATGCAAGCA AAACACTAAT GTACAGAAAA

     250     260     270     280     290     300
TAGAAATAAA TAAATTTTTA AACATTTTGC AAACTTAAAA AAAAAAAAAAG TCCCACCACT

     310     320     330     340     350     360
TTACAAATTC AAACAGGTTA AAATTTAGTG TCTTTTAAAC TCCAAAGTTT AAAGTTGAAA

     370     380     390     400     410     420
AACCTTTAAA ATCTAAAATA TTTTAAAAGC TAGCCTCTCA GCTGTGGGAT CCTATAACAT

     430     440     450     460     470     480
TGAAAACAAG CTTAATACTT CCTTATTTC AAGAGGAAGA ACCACGGCAC AGTCAACAAC

     490     500     510     520     530     540
CTGAACAAGC AAAACCAAAT ACCAGCTGTG TAAATAATTC GATTTCAGT GTCTGGGATT

     550     560     570     580     590     600
CAAACATGAT CTTCTGGGCT CCTCCAAAGG TCCTGAGTGC CTTCTCTGGT GCTGCCCTAT

     610     620     630     640     650     660
GCAGCCCTCA CATCTTGCTT TCTAGGCTGG GGCTGGCTCC ACCCCAAGGC TGCTGCTGCT

     670     680     690     700     710     720
GCTGCTGCTG CTGGTGATCA TCCAAGACA CCAGCATCTT CAAAATACTG TGGTCTTCTG

```

730	740	750	760	770	780
CTGCCACGGA	GGCTGCACTT	TCACCAACAG	CCTCTCCTGG	TCCCACACAG	TGCCATGCCT
790	800	810	820	830	840
CAGCTTCTCT	CCATGGCCTC	CTTATCCTTC	CAAACCCAGC	ATCATCTGAG	GATAACCTTG
850	860	870	880	890	900
TTCACCTTAA	CAGCACAGCT	TCTGTGTACT	GGTTCTCTCA	GGAAACACTC	CCCAGATTTT
910	920	930	940	950	960
ACCTCAGTGA	TGCAGGTCTC	TTCTAAATCA	CGGCCAGTTC	TGCAGAACAA	GCTAAGCAGA
970	980	990	1000	1010	1020
ACTAAGAATC	TCATTTCAAA	TATCAAACAT	CCCCAATGCT	CTCCTTGTTG	TTGTTTTTTG
1030	1040	1050	1060	1070	1080
TTTAAAATAG	AATCCCTTTA	TAGTTCTTGC	TCTCTTGGAA	CTCACTATGT	AGAATAGGCT
1090	1100	1110	1120	1130	1140
GGTTTTGATC	TCACAGGAGA	TCCATCTGCC	TCTGCCTCCC	AAAGGTGTGT	ACTACCCTAC
1150	1160	1170	1180	1190	1200
CCAGGAAATC	CTGGTGGTCT	TTAAGAAACT	CTCAAACCTC	CCTCTGTAAT	TTCACAAGGC
1210	1220	1230	1240	1250	1260
AGGCCTCCAT	CATCTGCCGT	ATTCTCAGCA	TTTTGAACTT	CCAAGCTCCC	ACAGAACAGC
1270	1280	1290	1300	1310	1320
CCACTGAGCT	CTGCATGGAA	CAGTTTCTCC	AGTCCAAAGT	TGAGAGGCCG	TACAATCTTC
1330	1340	1350	1360	1370	1380
TCAATACCAT	AGTCAGGTCT	TTCTTATTCC	TAACCCACAC	CTGATTCCAA	TTTGTGTCTT
1390	1400	1410	1420	1430	1440
GGCTAGGATT	TCTATTGCTG	TCATAAAACA	GCATGATCAA	AAGCAACCTC	AGCTTACACT
1450	1460	1470	1480	1490	1500
TTCAGGTCAC	ACCCCATCCA	CTGAGGGAGG	TCAGGACAGG	AACCTGGAGA	CAGGAGCTGA
1510	1520	1530	1540	1550	1560
TGCAGAGACT	ATGGAAGAAC	ACTGCTTACT	GGCTTGTTGTC	CTATGACTTG	TTCAGCCTGC
1570	1580	1590	1600	1610	1620
TTTCTTATAG	AACTCAGGAA	TGCCAGTGCA	GGGAAGGCC	AGTCTACAGT	GAGCACGGCC
1630	1640	1650	1660	1670	1680
TCCCACAAGC	CAATCTGTTG	GGGGTGTTTT	CTCCATTGAA	GTTTCCTCTT	CCAAAATGAA
1690	1700	1710	1720	1730	1740
TGTAGCTTGT	GTCAAATTGA	CACTGGCCAG	CACAGACCAT	GAGAGACTAG	AGAACGCTTC
1750	1760	1770	1780	1790	1800
CAGGCAGATC	CTCTATGGAG	TATCAGATAC	TCCGGGCTGC	TGAGTAATTT	GCACAGTTCC

1810	1820	1830	1840	1850	1860
AGGAATGGAC	CTGAGTTGGG	CAACAGCAAA	GAGATGAAGA	AACGACAAAC	ACAGACATCC
1870	1880	1890	1900	1910	1920
AGGAATCCTG	GGGTCATGTG	ATCTGGGCCT	TCTGCACACG	AGTTCTCTTA	GCACGTTATT
1930	1940	1950	1960	1970	1980
ATATAGAGTC	GAGTGGAGAA	GTGGGGTTAT	TGCCTACCAC	TGAAAAAGGC	AACTTATTAC
1990	2000	2010	2020	2030	2040
ATACAGTTAA	GCAAGGAGGC	AGGGTTTATA	TGCACAATGG	GATGGGGAAG	GCAGGTTGAG
2050	2060	2070	2080	2090	2100
TTAGTCTCCA	TAAGAAGTGT	CCCTGGAAGG	GAGCTATGTT	CATGCGTCAG	CACTCAAGGG
2110	2120	2130	2140	2150	2160
GGAGGATGGT	GAACACATTC	TACACACACT	GGCGACATGC	ACATCCATGC	GTGGACCAGA
2170	2180	2190	2200	2210	2220
AGAGAAGGCT	ATGTTTCCCT	CTGGGTCTGA	GGCTCTGGAG	TTGTTGACAA	GCTCATGTCA
2230	2240	2250	2260	2270	2280
ACAGCACACA	TCCCTTCAGC	ACCTCACAGA	CCTGGGCTTC	CTCTGAAGGG	CTCTGTTGCT
2290	2300	2310	2320	2330	2340
GAGGCAGGTG	GATGGGTGGG	TCCTGCAGGG	GGACAGGAGT	CTCAGCAGTA	CTTCCCCTGG
2350	2360	2370	2380	2390	2400
AACCCTGGTT	AGAGAAGCCA	TGAATCAGCA	GCGTGGCAGA	GCACTGGGGT	TCTGTGGTCA
2410	2420	2430	2440	2450	2460
CAGCATTGCC	AGCCCTGTGT	CAAGACAAAC	ACTACAGCAT	GGGGGCCATT	GACATTGAGA
2470	2480	2490	2500	2510	2520
AGGGGCGCTG	GTGAGTCTTC	TAACTGAACC	CCCAAGTCCT	CAGTATCTGG	GAGGGTGTCT
2530	2540	2550	2560	2570	2580
GATGGGGGTA	AGGTCCAAGC	TGAAGATTTG	GGGACAAGGT	GGTATCTGAA	AATCTACCCC
2590	2600	2610	2620	2630	2640
AGCACCGTCT	CCAGTGGACA	CACATATGAA	CACATCTGAG	GTTTCATGTGT	GCATGTGCTA
2650	2660	2670	2680	2690	2700
ATAGATGATA	GACACTGTAG	TGTGTGTGTG	TGTGTGTGTC	CATATATGGA	CCTGCACACA
2710	2720	2730	2740	2750	2760
CATCAGGAAA	TGCCTGTGTG	CTTGTTCCAG	CACTTGCAGA	CACATATCAG	AACATCTACA
2770	2780	2790	2800	2810	2820
CCTGTGTGCA	CACATCCACG	AACCGTGCAT	CTGTACAAGC	ACCTGCACCC	ATATGCACAG

2830	2840	2850	2860	2870	2880
ACTAAAGCAA	ACACAGAGGC	CTCTGCTTGT	CAGCGCGTGC	AAATGCAGGT	GCGGTGCAAG
2890	2900	2910	2920	2930	2940
ATGCTTGCAAT	GGAACCCACA	GAAGCTCCTC	TGAGGGAAAC	AAAAGCCACC	AAGTACATCG
2950	2960	2970	2980	2990	3000
GAGCAGGGGC	TGCCCCATCC	ATCCCACCTG	AGTCACATTT	TCTGGAAAGT	GTGAGCTATG
3010	3020	3030	3040	3050	3060
GTGGCCTCAG	TGAGAGTGAT	CGACCGGGGG	CTGGGCCTTC	TGGGGGCACA	GGAAGAAGAG
3070	3080	3090	3100	3110	3120
GAGGTACGTG	AGGAAAGGGG	AGGCACCAGA	CTTCAGCTTT	AAAGTGAGTC	CTAGGGGTGA
3130	3140	3150	3160	3170	3180
CAGGAACCTT	TTGCAGTTTG	CACAGCCCGA	GCGTGTTGGG	CAATTGTGGT	TTCCTCCGGA
	Exon I →				
3190	3200	3210	3220	3230	3240
GAGGAGGAAC	TCAGGCTTGC	CAACCCTTTC	CCTGGGCTTC	GGAGCCTCAG	CTGCTCTGGC
3250	3260	3270	3280	3290	3300
ATGGAGAGTG	TGGTACAGCC	TTCAGTGTTT	GTGGTGGATG	GACAGACGGA	CATCCCATTC
START					
3310	3320	3330	3340	3350	3360
AGGCGGCTGG	AACAGAACCA	CCGGAGACGG	CGCTGTGGCA	CTGTCCAGGT	CAGCCTGGCC
3370	3380	3390	3400	3410	3420
CTGGTGCTGC	TGCTAGGTGC	TGGGCTGGCC	ACTCAGGGCT	GGTTTCTCCT	GAGACTGCAT
3430	3440	3450	3460	3470	3480
CAACGTCTTG	GAGACATAGT	AGCTCATCTG	CCAGTAAGTG	GGGCTTGGGG	AACCAGCGAG
		← Exon I			
3490	3500	3510	3520	3530	3540
TCTTCTCCAG	TACCTGTCCC	TTTATGGTTG	TGTATTGTGT	GCTAGAACCC	AGGGCTTCGG
3550	3560	3570	3580	3590	3600
TTAGCCTGTC	TCTCTGACCC	TCAGTCTTCT	CATCTTTACA	TGAGGATCTG	ATACACGTGC
3610	3620	3630	3640	3650	3660
AGTGCCCGGC	AGTTTCCTTG	GGATTCACCT	ACTCGGTTGT	TGTTTCAGC	CCAAACCTTT
3670	3680	3690	3700	3710	3720
GTCCACCACT	GGCTTCATGG	TCACCCTGCT	TCACTCGCAG	CTCTCTCATG	TGCTTGCTCA
3730	3740	3750	3760	3770	3780
CTGTTCCCTT	CAGACAAGCC	ATGGGTGTGT	CACAGTATGC	TCCCGAGTCT	TTGCCTATAT
3790	3800	3810	3820	3830	3840
TTTCTTTTTA	AGTTTTTTTT	TTTAATTACA	TTTACTTATT	TAGTGTGTAG	ACATGAAAAA
3850	3860	3870	3880	3890	3900
GTATGCATGT	GCCGCAGCAT	GTATGTGGAA	CACCTCTATG	GAATCACTTC	TCTGTGCCTT

3910	3920	3930	3940	3950	3960
CCTTTGTGGA	GGGTCCTAGG	GACTGAACTC	AGGTAGCCAG	GCTTGGCAGC	AAGCACTTTT
3970	3980	3990	4000	4010	4020
ACCGCCTGAG	CCCTCTCACC	GGCCCTCAAC	TATCCAAAAA	CCTCGAAAAC	AGTTCCGAAA
4030	4040	4050	4060	4070	4080
CAATTCTAGT	CTCAAGCATT	TCAGACACTC	GACTTGACTA	GTTAATTCCT	CATCCCAGCA
4090	4100	4110	4120	4130	4140
CTTGGGCAGG	GGAGGCAGAA	GACTGAGGGA	GTTCAAGGTC	ATCCTAGGCT	ATTTAGCAAG
4150	4160	4170	4180	4190	4200
TCTGAGGCCA	GACTGGGCTA	CATGAGAGCC	TATCTTGAA	ATACAACAGA	TCTAATTAGG
4210	4220	4230	4240	4250	4260
TGTGTGCCCC	TCCCCCTGCA	TCTGTGTGTA	TGTATGTGAT	ATGTGCATGT	GTGGCTCTGC
4270	4280	4290	4300	4310	4320
ATACATGTCC	ATGGGTGGTG	TCTGTGGCCA	TGGCCAGACA	GTCTCATCAC	CACATAACCAG
4330	4340	4350	4360	4370	4380
TGAGACTCGG	AGCGGCATGT	CCTTACCAA	CATCCCTGTC	TGCATTTTCAG	GATGGAGGCA
					Exon II →
4390	4400	4410	4420	4430	4440
AAGGCTCCTG	GGAGAAGCTG	ATACAAGGTG	AGTTTGGGCC	CCAGTCCCTT	TGAAGCAGGT
					← Exon II
4450	4460	4470	4480	4490	4500
GGAATGGTTT	CCGCTCAGCA	CCTCCCCACA	CCAACCTCTGG	GTCATCACCC	AGTGTACAT
4510	4520	4530	4540	4550	4560
TGTAGGCCTC	GCAGGTGCC	CTCCCCCAGG	GCCAGAGAAG	CAGAAATCTG	GGTCCAAAAG
4570	4580	4590	4600	4610	4620
GGACAGAGCC	TGACACAGGT	AGCCTCAATT	GATGTGTGAG	AAACTTCGGG	TACACACACA
4630	4640	4650	4660	4670	4680
CTGAGACATG	CGTGCACACA	CACACATACA	CACACACACA	CACACACACA	ATCCTCTTTT
4690	4700	4710	4720	4730	4740
TGTCTCTAAC	CTTTGACTCT	CTTCCTCAGA	TCAACGATCT	CACCAGGCCA	ACCCAGCAGC
					Exon III →
4750	4760	4770	4780	4790	4800
ACATCTTACA	GGTGAGAGGG	ACCCAGATC	TTCACACGGA	ATGGGGTTTA	GCATGTCCTG
					← Exon III
4810	4820	4830	4840	4850	4860
GGAGACTCAG	ATCTTTATAA	GTTAGAGCAC	TCGTTTATGC	ATTCATTTAG	TGTGTCTTTA
4870	4880	4890	4900	4910	4920
AATTTTTTTT	GACATTTACT	TCTTTTTTATT	CATTTATTAT	TGCACATGTG	CATGCCATAG

4930	4940	4950	4960	4970	4980
TGTAGAGGTC	AGAAAACCTCT	CAGGGGAACG	ATTCTTTCCT	TCCACCTTTT	GGCCTCCGTG
4990	5000	5010	5020	5030	5040
TACTGATCTC	AGCCATCAGG	CTTGGCTCTA	AGTACCTTTA	CTCTCTGCGC	CATCTTGCCG
5050	5060	5070	5080	5090	5100
GTCACCTTTT	TTTTTCTCAG	TGTTTACTAA	AAAACAGCCC	AGAGAAGAGC	CACAGGGAGC
5110	5120	5130	5140	5150	5160
CATGTAAAGT	CAACTCTTCA	CCCTGCTAGT	CATGGGGACA	CATCCCAAGG	TCCTTGGAGG
5170	5180	5190	5200	5210	5220
CCTCAGAAGA	TGTTGGGACT	CAGACCTACC	ACAGTTTATA	TTTGTTTGT	TGTTTGGTTG
5230	5240	5250	5260	5270	5280
GTTGGTTGGT	TGGTTGGTTG	GTTGGTTGAT	TGGTTGGTTG	GTTTTGGTTT	TGGAGACAGG
5290	5300	5310	5320	5330	5340
GTCTCTCTGT	GTAGCTTGGG	CTGCCTGGGT	AGACCTGCCT	CTGTCCTGAG	TACTGGAATT
5350	5360	5370	5380	5390	5400
AACAGGAATT	AACGACGTGG	GCCACTACAC	CCAGCTGTAT	ATACTGGTTT	TTCTTTTGGC
5410	5420	5430	5440	5450	5460
ATAGACAGTT	TAATTTATAA	TTTAAACAAGT	AAGAAACTAA	CAAGAATACA	CATAAAGTAT
5470	5480	5490	5500	5510	5520
GCTGTAATTA	AAAACCTATTT	TTGAAACATG	ATGTGGGAGA	TAGGGAGGTG	GCTCCATGTG
5530	5540	5550	5560	5570	5580
CAAATTGCTA	GCCACTTTTG	ACTCAACATC	TGAGCCAAAA	GCCAAACACA	CACTCCCCTG
5590	5600	5610	5620	5630	5640
ACAGTTACAG	AGGCAGATTC	AGACAGACAC	ACACTCCTGT	GACAGTCATG	GAGACAGAGA
5650	5660	5670	5680	5690	5700
CAGGCAGAGA	GGTCCCTAGG	ACCTGCTGTC	CAGCAGCCTT	GACAAACAGG	GGACTTCCAG
5710	5720	5730	5740	5750	5760
GGTCAATAAG	AGACTCTGCC	TCAAAACTAA	GGTGGACAGA	GGTTGAAACT	GAGGAAGTTG
5770	5780	5790	5800	5810	5820
CCTGGTTTTG	ACTTCTGGGC	ACACACACAC	ACACACACAC	ACATATATAT	AACACATACA
5830	5840	5850	5860	5870	5880
TCACACACAT	ATACACAAAC	ATACAGTCAC	ACACACTTTT	TGAGATAGAG	TCTCATGTAG
5890	5900	5910	5920	5930	5940
CCTAAACTGG	CCTTGAATC	TTGATCCTCC	AGACTCGACG	TCCCAAGATC	TGGATGTCAC
5950	5960	5970	5980	5990	6000
CACTACACCT	GATTTATTTG	GTACTGGGGC	TGGAATGTAC	AGCCTTCGGC	ATGCTGGGCG

6010	6020	6030	6040	6050	6060
AGTGTTCCAC	CTCCTAAATC	CTAACCCCAT	TTAAAAAAA	TTTTTTTGAC	ATTTCACTAG
6070	6080	6090	6100	6110	6120
GAAGCTTCAA	TACCTTGTGC	CTCAGTTTCC	TCTTTGGTAT	TCAAGTGACT	TTGCTCCTCA
6130	6140	6150	6160	6170	6180
GTGCTTCAGT	GTCTACCCTT	GCAGAAGGAG	ATGGGAATGA	ACGGAGTTAA	GACACAACCA
6190	6200	6210	6220	6230	6240
CCAAATTACT	TTGCTTGCTT	TCCTGTATCT	CAGTTTCTTC	CCCCTGCAAG	ATAGGAATGG
6250	6260	6270	6280	6290	6300
GCTGAGTCAA	CCCAGACAAG	CAGCCTACTA	TGGTGGTGAA	ACCAGAGGGA	ACTAGCATAA
6310	6320	6330	6340	6350	6360
GGTCACACAG	AAAGGGTGGG	CACAATGCTA	ACCGTGCTGA	CGGTTATCT	TTCTCTCTCC
6370	6380	6390	6400	6410	6420
TTTCCTCCCA	GGAGCCAACG	CCAGCTTGAT	AGGTATTGGT	GGACCTCTGT	TATGGGAGAC
	Exon IV →				
6430	6440	6450	6460	6470	6480
ACGACTTGGC	CTGGCCTTCT	TGAGGGGCTT	GACGTATCAT	GATGGGGCCC	TGGTGACCAT
6490	6500	6510	6520	6530	6540
GGAGCCCGGT	TACTACTATG	TGTACTIONCAA	AGTGCAGCTG	AGCGGCCTGG	GCTGCCCCCA
6550	6560	6570	6580	6590	6600
GGGGCTGGCC	AATGGCCTCC	CCATCACCCA	TGGACTATAC	AAGCGCACAT	CCCGCTACCC
6610	6620	6630	6640	6650	6660
GAAGGAGTTA	GAAGTGTCTG	TCAGTCGGCG	GTCACCCTGT	GGCCGGGCCA	ACAGCTCCCG
6670	6680	6690	6700	6710	6720
AGTCTGGTGG	GACAGCAGCT	TCCTGGGCGG	CGTGGTACAT	CTGGAGGCTG	GGGAAGAGGT
6730	6740	6750	6760	6770	6780
GGTGGTCCGC	GTGCCTGGAA	ACCGCCTGGT	CAGACCACGT	GACGGCACCA	GGTCCTATTT
6790	6800	6810	6820	6830	6840
CGGAGCTTTC	ATGGTCTGAA	GGCTGCGGTG	ACAATGTATT	TTGTGGAGGG	ACCTCTCCAG
	STOP				
6850	6860	6870	6880	6890	6900
GACTCACCTC	AAACCCAGCA	ATAGGGTTTG	AAGTCCTCCC	TTTAAGGAGC	CCTGAACTCT
6910	6920	6930	6940	6950	6960
GCAGTGCTCG	GGGCGGTGTA	GACTGCTGAC	CTGCTTTGGG	CAATCTTCAA	ATCAGAGACC
6970	6980	6990	7000	7010	7020
TGGAGACTTG	GGGCGTGGAG	CCCAGGAGCG	AGGGGTCAGC	TCATTTGCCT	GATATTCAGG

7030	7040	7050	7060	7070	7080
AAGAAAGAAT	CAAGCTGGGG	TATTTATGCT	TCTGATGCAA	ACACTGAGAT	TTCGGCTTTC
7090	7100	7110	7120	7130	7140
TGGGTTTTGA	GCTGGAGGCA	AGAAACCTTC	CCAGAGTGTC	ATCAGGACCA	TGTTGGCAGG
7150	7160	7170	7180	7190	7200
ACTTGGGGCT	CCAGACTTGC	CACCACACTC	TGGCCTCTCC	CATCCATCCG	CTGCATTGGT
7210	7220	7230	7240	7250	7260
TTCCAGCCAC	CAAAACAGCA	CTGGCCCCCT	GGCTGCAACT	GGCCAGGTAC	GAGCTTCTGA
7270	7280	7290	7300	7310	7320
GCACCTACAT	TCCTCAGGGA	CATCTTGATG	AGATCTCAGT	ACTCAGTCCA	ATGCGCAGCA
7330	7340	7350	7360	7370	7380
GCGACAGACA	TGCCAGGAAT	GGTTGGTCAG	AAGGGAAGGG	AGGAAAGGGA	GAAAGAAGG
7390	7400	7410	7420	7430	7440
GAATGCAGAA	GAGAAGGGGG	GAAAACAAGA	CCAAAACAAA	ACAGCAACAA	CAAAGCGGCA
7450	7460	7470	7480	7490	7500
GGGAGGAGGT	GACACCCTTG	GGGATACTTT	AGTCAACACA	CTTAGAACAG	ATTGTGCCAG
7510	7520	7530	7540	7550	7560
GCCTGTTGGA	TTCCTGGAGT	TGATGGGATC	GTGGGAAGGC	ACAATGGGGA	GCAAGTGGGC
7570	7580	7590	7600	7610	7620
TTGGGTTATG	GCTCAGTGGG	TAAAGTGCAA	TTATGGGGAT	CTGAGTTTGA	ATCCCTGGTA
7630	7640	7650	7660	7670	7680
CCCATATAAA	GACACAGATG	CGGTGATGGG	CACTTGTGAC	AATGAGATCA	TCAATAGGGA
7690	7700	7710	7720	7730	7740
ATGGAGACAG	GAGGGACCTC	TGGGGTTCAC	TGGCCAGGCA	GTCTAGCTGA	ATCAAAGAGC
7750	7760	7770	7780	7790	7800
TCCAAGTTCA	GTCGATAGCT	CCTGAAGATG	ACAACCTGAGG	CTATTCTCCA	AACCCACAC
7810	7820	7830	7840	7850	7860
GCAGGACACA	TGCGTAAATAA	ATAAAATTTT	AAAAATATTA	AATAATAGTG	TTTGAGAGGC
	2 mögl. Polyadenylierungssignale	←	Exon IV		
7870	7880	7890	7900	7910	7920
ACTTTATATG	TTCTAATCAT	TTGTGCTTTT	GTTTATTTGT	TCAGGTTTGT	TTGTTTGTTT
7930	7940	7950	7960	7970	7980
GTTGGAAGAC	AGGGGTCTCA	AGTAGCCAG	GCTAGCTTTG	AACTATATAT	TTCATATATT
7990	8000	8010	8020	8030	8040
TTGAGGCAGT	CTTATGCCTT	TTATCTAGGT	TTTCTTGGCA	TCTAAAGCTA	TAGCTGTGTG
8050	8060	8070	8080	8090	8100
TTACTCCAAT	GGAACATCTG	GGCAGTTACC	CAGCACCTTC	AAATGCAGAG	CCCACACCTG

8110	8120	8130	8140	8150	8160
ATAGGGTCGG	GCTCGCCCTG	CTCAGGGGTC	GCTGCTAGTC	CAAGCCAGTC	CAAGCGGACT
8170	8180	8190	8200	8210	8220
TCCCGCGTCC	TGTCCTTGCA	ACCCTGGTGG	GAGGTGGAAA	AGCCCCAAA	TACCCAGTCT
8230	8240	8250	8260	8270	8280
CACCCTCCAT	CGGAGTTTCC	TTTATGCTTA	TCACGGCCTG	TTTCCGTGTC	TTTGATGAGA
8290	8300	8310	8320	8330	8340
CCAAGGTGTG	GGGACAGTAT	ATTTATAAAA	AGCCACCAGC	AGTTTCCGCT	GTAAGGAAAA
8350	8360	8370	8380	8390	8400
AAAAATCACT	CTAGATTTTT	CTCAGCCTTG	AGGAGAGTAG	AAGGAAGGGG	GGGTGGCTGA
8410	8420	8430	8440	8450	8460
GAAAGGGAAG	TAGGAAAGAA	GGTAAACTG	TGAGGGGAGG	AACAAGGAAG	AGGGCCAAGA
8470	8480	8490	8500	8510	8520
AGAATGGGGG	GCAAGGGGTA	CCCAAGGGAG	GCTGATCCCG	GAGGTGTAGG	CATTGGCAAT
8530	8540	8550	8560	8570	8580
TTTAGATAAA	GCCTAGAGGC	AGGAAGCCCC	GGCCAAGACA	TTGACCTACT	TGTGTTTCTG
8590	8600	8610	8620	8630	8640
AGAAGGTTAT	CTGATGAGTT	TCCTCTTCTA	CCCCTGGGGC	CCCACCACCC	ACTGCTCCCT
8650	8660	8670	8680	8690	8700
GGGACACCAT	TCTCCCCTAG	GCAGTTGCTG	ACCCTTATCT	CTGATAACCC	TTCTTCCCCT
8710	8720	8730	8740	8750	8760
CACCTCCTAC	CAAGACCCCC	CAAATAATGA	TGGTGTAGCA	ATGTCGTAGG	ATGGTGCTAC
8770	8780	8790	8800	8810	8820
AGCTCATCTG	CTAACCCTG	TTAAAATGAG	AGCTGTCGTC	ACAGAGAAAT	CTTATGGCTC
8830	8840	8850	8860	8870	8880
TTATGTTCTG	GAGTTGATGT	TCAGAGTTCA	AATCCCTGCT	CTGCCACTTC	CCAGGCTGGG
8890	8900	8910	8920	8930	8940
TGACTTTGAG	ACCCATCTTT	GGCACCTCTG	GGCCCCAGTT	TTCCCATCTA	TGTAGTTTGG
8950	8960	8970	8980	8990	9000
GCTACAGTGA	GCTCCTTTAT	CTTTAGTGAC	TATTCTTTAT	GTAGATGTAG	TTGTTGCTAT
9010	9020	9030	9040	9050	9060
GCCGCATATG	TGTCTCCCCA	GAGATGGTGC	TTGGGTATTC	CACTTCCCTC	CAAACCTGCTG
9070	9080	9090	9100	9110	9120
GTAAGAGATG	TCCCAGAGAC	CTCCAGAACA	GTACAAGCTA	TTGCCACTGC	TCTTTATTGC

9130	9140	9150	9160	9170	9180
CCACCAGAAC	CTGATAAGAC	CCTAGCATGT	CATCTTACTC	AGCTGTGAAC	TGTGTGAACA
9190	9200	9210	9220	9230	9240
ACAATAACTG	GTTTGACAAG	ATGGACCCAC	TGGTGCAATA	GCTAGGTGAC	TGTTACTGTG
9250	9260	9270	9280	9290	9300
GTAACAAACC	ACTTTCTGGT	TGGATTTAAG	GACCACTCCA	CAGAAGAAAA	GTCATACCTG
9310	9320	9330	9340	9350	9360
GTACTGTGAA	CCCAGCCAAG	AAGCCATGTT	TTGGGCACTC	ACAGACCCCA	AGGGTGAACC
9370	9380	9390	9400	9410	9420
TACTGTTACT	TTGCTAGCTG	GACATAGTGT	GAAAAGCCCT	CTAACTTAGT	ATCTTGCTAT
9430	9440	9450	9460	9470	9480
GCAGCAATCC	ATGAGGCTCT	CAGACCTCAT	CAGAGAGGTT	TCCTCATTGC	AGTGTCCATA
9490	9500	9510	9520	9530	9540
GTTAATGCTG	AAACTCACAA	CGGGTTACAG	AGCAAAGAGC	AAGAGACTGA	GGAATGCCCA
9550	9560	9570	9580	9590	9600
GTCACAAATG	GGAAGTCTGT	GCCACATCAC	TCCCCAAGGC	TCAGAGACCA	TCATGGAAGA
9610	9620	9630	9640	9650	9660
AGGGGCAGAA	AAACTGTAAT	GGTCTGATCA	GGCAAGGCCA	GAGCAAACCA	GTGTCTTCTG
9670	9680	9690	9700	9710	9720
GCTATGAAAG	GACCCAGCAA	CTGTGAACTA	CAGCAGCTGT	GGTCCATGCA	CAGGATCAGG
9730	9740	9750	9760	9770	9780
TCAGGCCACC	TTGCAGCACG	GAGAAGCAGT	TTTCTTCAAG	GGTGTGGCTC	CTAGTACTCC
9790	9800	9810	9820	9830	9840
AACTGCTCC	AGTGGATGAC	ACTCACCCAT	GCTGGTTGTG	GCATTTGAAT	GAAGATGACC
9850	9860				
CCCCACACAC	AACTAGT..				